

李云清, 谢瑞真, 李静, 等. 锦葵科作物 SSR 标记在玫瑰茄中的通用性分析 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (3): 302–311.

LI Y Q, XIE R Z, LI J, et al. Universality of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers from Malvaceae plants to Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (3): 302–311.

锦葵科作物 SSR 标记在玫瑰茄中的通用性分析

李云清^{1,2}, 谢瑞真³, 李静^{1,2}, 林荔辉^{1,2}, 陈冀涵³, 方平平^{1,2*}, 陶爱芬^{1,2*}

(1. 福建农林大学作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福建 福州 350002;

2. 福建省作物设计育种重点实验室, 福建 福州 350002; 3. 福建农林大学金山学院, 福建 福州 350002)

摘要:【目的】丰富玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* L.) SSR 分子标记的种类和数量, 验证锦葵科作物 SSR 标记在玫瑰茄中的通用性, 进而分析玫瑰茄的遗传多样性。【方法】选取锦葵科红麻、棉花、黄秋葵和木槿等 4 种作物共 62 对 SSR 引物 (木槿 17 对, 其他各 15 对), 对 8 份不同来源的玫瑰茄种质进行多态性分析。【结果】62 对 SSR 引物中有 58 对具有通用性, 占比为 93.5%; 通用性引物中有 48 对具有多态性, 占比为 82.8%; 这些引物共扩增出 246 条条带, 其中多态性条带 239 条, 占比 97.2%。同时, 棉花有 14 对 SSR 引物具有多态性, 多态性引物比率最高, 达 86.7%; 其次是木槿, 有 82.4% 的引物具有多态性, 且其引物多态信息含量值 (PIC) 最高, 为 0.685; 而黄秋葵和红麻多态性引物比率较低, 分别为 73.3% 和 66.7%。另外, 聚类分析结果表明, 在相似系数 0.49 处可将 8 份玫瑰茄种质分为 3 个各具特点的亚类, 其中 19FZ-76 被单独聚为一类, 表明这一种质与其他 7 份种质亲缘关系最远, 遗传差异最大, 聚类结果与其表型性状表现一致; 而来自缅甸的 19FZ-74 和漳州本地种遗传相似系数最高, 说明这两份种质的亲缘关系较近, 遗传差异较小, 表明我国福建种植的玫瑰茄品种与东南亚的品种有较近的血缘关系, 有可能从东南亚引种而来。【结论】锦葵科作物的 SSR 引物在玫瑰茄中具有较好的通用性, 筛选出的 SSR 标记可为玫瑰茄品种鉴定、亲缘关系分析、遗传图谱构建等遗传学研究提供可靠方法。

关键词: 玫瑰茄; SSR 标记; 通用性; 遗传多样性

中图分类号: S563.9

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 03-0302-10

Universality of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers from Malvaceae plants to Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)

LI Yunqing^{1,2}, XIE Ruizhen³, LI Jing^{1,2}, LIN Lihui^{1,2}, CHEN Jihan³, FANG Pingping^{1,2*}, TAO Aifen^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fuzhou, Fujian 350002,

China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Crop Breeding by Design, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Jinshan College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract:【Objective】Universality of simple sequence repeat (SSR) markers of members of Malvaceae family and roselle herbal plants was examined to extend the genetic information bank. 【Method】A total of 62 pairs of SSR primers were selected from *Hibiscus cannabinus*, *Gossypium* spp, *Hibiscus esculentus* L, and *Hibiscus syriacus* L. of Malvaceae family. They included 17 pairs from rosemallow and 15 pairs from each of the other crops to compare for polymorphism with those of 8 accessions of *Hibiscus sabdariffa* L. germplasms. 【Result】Of the 62 SSR primers, 58, or 93.5%, were found common and 48, or 82.8%, polymorphic between the two groups. And out of 246 bands amplified, 239, or 97.2%, were polymorphic. Among the Malvaceae family members, cotton had 14 primer pairs polymorphic at the highest rate of 86.7%, while the rate with rosemallow primers 82.4%, with okra primers 73.3%, and with kenaf primers 66.7%. The PIC of rosemallow primers was the highest at 0.685 among all. A cluster analysis classified the 8 roselle accessions into 3 groups at a similarity coefficient of 0.49.

收稿日期: 2022-11-11 初稿; 2023-01-17 修改稿

作者简介: 李云清 (1996-), 女, 研究方向: 特色经济作物遗传育种 (E-mail: lyq17853514030@163.com)

* 通信作者: 方平平 (1968-), 男, 副教授, 研究方向: 麻类作物遗传育种研究 (E-mail: fangpp1990@qq.com); 陶爱芬 (1976-), 女, 副研究员, 研究方向: 麻类作物遗传育种研究 (E-mail: 281770126@qq.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-16); 福建省南方麻类种质资源共享平台项目 (PTJH20006); 福建农林大学校内创新基金项目 (KFA17164A、KFA19028A)

The strain, 19FZ-76, was clustered by itself in the genetic relationship significantly far from other accessions that was reflected by the phenotypic traits as well. The greatest genetic similarity coefficient was observed in the 19FZ-74 cultivars from Myanmar and Zhangzhou, indicating a close genetic relationship of the two accessions and the likely origin of the roselle in Fujian. 【Conclusion】 The SSR primers of Malvaceae plants including roselle showed a certain universality. The selected markers could provide a reliable venue for genetic studies, such as variety identification, relationship analysis, and map construction on the herbal plant.

Key words: Roselle; SSR markers; universality; genetic diversity

0 引言

【研究意义】玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* L.) 为锦葵科木槿属一年生草本作物, 起源于热带非洲, 属于麻类作物红麻的近缘种, 俗称洛神花、芙蓉茄等^[1-2]。玫瑰茄是一种药食两用植物, 其萼片含有蛋白质、粗纤维、维生素等丰富的营养物质, 以及花青素、有机酸等生理活性成分, 具有抗氧化、降血压和抑菌抗癌等功效, 而玫瑰茄籽是优质的食用油原料^[3-5]。玫瑰茄属于短日照作物, 主要在福建、广东、云南、海南等地栽培, 是有较大发展前途的经济作物^[6]。我国栽培的玫瑰茄由国外引种而来, 之后经各地区间引种、育种并各自对品种命名, 产生了一系列品种混杂、遗传关系不明的问题, 影响了玫瑰茄种质资源的保存、亲本选配以及品种选育等研究的开展。而 SSR 分子标记是对作物进行种质资源鉴定和遗传多样性分析的有效方法^[7], 因此获得适用于玫瑰茄的 SSR 标记显得尤为重要。【前人研究进展】简单序列重复 (Simple sequence repeat, SSR), 又叫微卫星 DNA, 具有特异性、共显性和在基因组中分布广等优势, 已被广泛应用于作物种质资源鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建及 QTL (Quantitative trait loci) 定位等研究中^[8-11]。SSR 两端的序列是相对保守的单拷贝序列, 尤其在亲缘关系相近的物种间是保守的^[12], 因此, 对近缘物种的 SSR 引物进行通用性验证, 是获得 SSR 标记的有效途径之一^[13]。Kim 等^[14]研究发现, 基于红麻转录组序列开发的 SSR 标记, 在其他木槿属植物上通用性比率为 83%~99%。Pratik 等^[15]利用棉花和黄麻引物对 22 种锦葵科作物进行了通用性分析, 发现 2 种作物的 SSR 均在其他植物中表现出较高的多态性和分辨率。方书生等^[13]的研究表明, 棉花的 SSR 标记在红麻上具有较好的通用性。另外, 红麻、旱地木槿和黄秋葵等锦葵科作物 SSR 引物在近缘物种中的通用性也得到了验证^[16-18]。【本研究切入点】由于玫瑰茄基因组尚未破译, 分子生物学研究相对落后, 目

前玫瑰茄 SSR 标记开发利用的研究尚未见报道, 限制了玫瑰茄遗传及育种等研究的开展。【拟解决的关键问题】获得通用性标记是加速物种遗传多样性、亲缘关系和物种来源研究的有力策略^[14]。本研究利用棉花、红麻、木槿和黄秋葵等已开发的 SSR 标记引物的锦葵科作物, 对不同来源的玫瑰茄 DNA 进行扩增, 以验证其在玫瑰茄上的通用性, 并对其多态性进行评价, 筛选适用于玫瑰茄的 SSR 标记, 从而为玫瑰茄种质鉴定、亲缘关系分析、遗传图谱构建以及 QTL 定位等研究提供有效方法, 对玫瑰茄新种质创制及分子标记辅助育种等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 本试验所用的 8 份玫瑰茄种质资源, 分别由福建农林大学麻类研究室、中国农业科学院麻类研究所和福建省农业科学院亚热带农业研究所提供。2021 年 4 月中旬, 将 8 份材料的种子分别播种于直径为 20 cm 花盆中, 基质为 Pinds 营养土, 每盆 5 株, 于福建农林大学田间科技园进行常规栽培管理。待玫瑰茄幼苗长至 3~4 片真叶时, 取各品种幼嫩叶片提取 DNA。试验所用材料的名称和来源地见表 1。

1.1.2 SSR 引物 本研究选取了 62 对来自红麻、棉花、黄秋葵和木槿的 SSR 引物, 其中红麻 15 对、棉花 15 对、黄秋葵 15 对、木槿 17 对。引物由北京擎科生物科技有限公司合成, 具体序列信息见表 2。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法^[19] 提取基因组 DNA, 用 NanoPhotometer spectrophotometer 检测 DNA 浓度与纯度, 随后采用琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量, 并用 TE 溶液将符合要求的 DNA 稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 SSR 引物通用性分析 PCR 反应体系及程序在方书生^[13]等的方法上进行改进, 具体如下: PCR 体系为 $20 \mu\text{L}$, 其中包括 $2.0 \mu\text{L}$ DNA ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、 $1.0 \mu\text{L}$

表1 供试玫瑰茄的名称、来源地及主要性状

Table 1 Names, origins and main phenotypes of roselle germplasms

编号 No.	名称 Name	来源地 Origin	主要性状 Main phenotypes
1	FAFU1	中国福建	紫色肉质花萼, 掌状浅裂叶, 茎紫红色
2	H150	中国湖南	无肉质花萼, 掌状全裂叶, 茎紫红色
3	19FZ-74	缅甸仰光	无肉质花萼, 掌状深裂叶, 茎紫红色
4	白桃K Baitao K	中国广东	绿色肉质花萼, 掌状浅裂叶, 茎浅绿色
5	Zhangzhou native cultivar	中国福建	紫色肉质花萼, 掌状深裂叶, 茎紫红色
6	MG5	中国福建	红色肉质花萼, 掌状深裂叶, 茎紫红色
7	MG6	中国福建	紫色肉质花萼, 掌状浅裂叶, 茎紫红色
8	19FZ-76	中国福建	紫色肉质花萼, 掌状全裂叶, 茎紫红色

引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、 $10 \mu\text{L} 2 \times \text{Taq Master Mix}$ 、 $7 \mu\text{L dd H}_2\text{O}$ 。PCR 程序为: 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 10 个循环, 每个循环退火温度降低 0.5°C ; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法染色后读带。PCR 仪为 BIO RAD T100 Thermal Cycler, 所需试剂购于厦门泰京生物科技有限公司。

1.2.3 数据分析 采用人工读带的方法, 将聚丙烯酰胺凝胶电泳图上的条带转换成“0、1 矩阵”数列, 即在相同位置处, 条带清晰的记为 1, 无条带或条带模糊难辨的记为 0。利用 Popgene 3.2 计算每对引物的平均等位基因数 (Na)、有效等位基因数 (Ne)、Shannon's 信息指数 (I)、观测杂合度 (Ho)、期望杂合度 (He) 和 Nei's 基因多样性指数 (H) 等遗传多样性参数。引物多态信息含量 (PIC) 利用 PowerMarker 计算。最后利用 NTSys 软件计算 8 份玫瑰茄种质的遗传相似系数, 并绘制遗传聚类图^[20]。

表2 供试引物名称和序列信息
Table 2 Names and sequence information of SSR primers

来源 Origin	名称 Name	引物上游序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	引物下游序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
木槿 Rosemallow	HA-1	TTGAACATAAACAAAGCGG	AAAACAAGTTGGGGAGG
	HA-2	CTGAATGCCAGAACATGACT	CAGGCAGAAAGAGGAAGAT
	HA-3	ATCATTATCATCTTCGTTTC	AAGGGACCAAAGTCTCAA
	HA-4	CACCAAATCCTGGAGAAG	GCAAACGAGAATAATCAAA
	HA-5	GCGTGGATGTTCTTCTT	TCGAACCCTATGGATGTA
	HA-6	GAACAAGCCTGTCACTAA	CACAAACCGATTACGAT
	HA-7	CAGCAGTTAGAGCAGGAGGT	TTCGGACATGAGTATGGAT
	HA-8	CACTTCCACGAAGCTTAC	GGAGATAAACAGAAAAGGTA
	HA-9	TATGGTTTAGTGCTGTAT	TAGGTTGCTGAATCTTTTC
	HA-10	CCCAAACCTCTATCATCT	ATATCCCTAGTTCTGCT
	HA-11	CACCAAATCCTGGAGAAGTA	GGCAAACGAGAATAATCAA
	HA-12	AAGGAGAAGCCAAGGTGAAA	GACAAACCCACATACAGGAA
	HA-13	ACTTTATCGTATAGACCA	GAACACCTTATTTCAGTGT
	HA-14	GAAATGGCAAGGTTTAGAT	CTCAACTTTGTGATGTGGC
	HA-15	CAGCCACAATCCTCCCTAACT	GAAGGGTAACCTGTTCACG
红麻 Kenaf	HDAT-1	CCCTCAAGTGTCTCT	TCAATTACACCTCCGTACCC
	HDAT-2	TGTCAAGCTGTCAAGGGTGA	CCGATCCGTGTTTCAAGT
	HcES0010	AGCACATTCCCGTTGCTAA	TGCAGCAAAGCAATGTAGGC
	HcES0011	GCTAAGCTGGTTCTGGGA	CCCAACAGCTTCTATTCACTGC
	HcES0012	CCCCCTCCATTGGTTCT	AACCCAGCAATCCCTGGTT

续上表

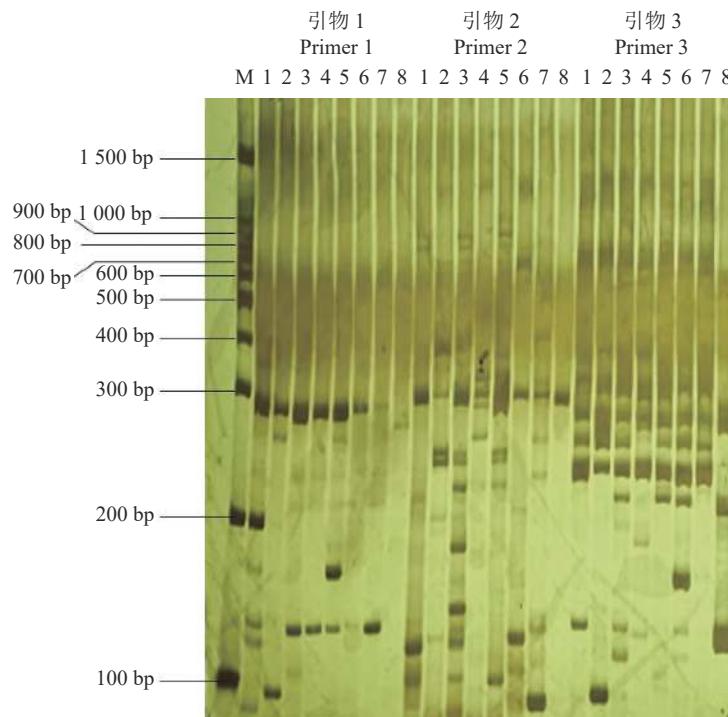
来源 Origin	名称 Name	引物上游序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	引物下游序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
红麻 Kenaf	HcES0014	CGTGCATGTCGTGAAATCCG	ATTACAAAGTGGCAGGCAG
	HcES0015	TGGGAAAGGGATTGGAACCA	ACAATTCCGTACCCACCTCC
	HcES0020	CACGTGTGACCACAGAGCTA	AACAAAACATGCAGCTCCCG
	HcES0041	ATCCAATCCAATCCAAACTCCT	TCAGGTATAAGTCGGGGCGT
	HcES0042	CCCCATTGACTCGAGGCTTT	AGCCTTACAATACTTAGTCCGGT
	HcES0060	AGGTGTCTGGTACTGGTCA	GTGCAAGAACTGGAGTTGCG
	HcES0063	AGTTGGATCTGCTGACACG	CTGAACCGAAATCAAGGCACA
	HcES0064	CCACTAGAAGTTATCGTGGCC	AGAGTATGTGCACGGGAAGC
	HcES0070	AGGCTGTTGCTGAGCTGAAT	CGCCGTTAGCAATAGCAACC
	HcES0075	CAGGAAGGAAATGGGCAGGA	ATCGACCGAAACTCGAGAGC
棉花 Cotton	HcES0085	AGCCATCCCATTGCAAGACA	TCACTGCATCACCCCTCCAA
	HcES0087	CCTCTGATGCATCCGTTCT	ATCTCCAGGGTGTGCGTT
	C2-0004C	TTTGTGTTGCGTTCTTTA	TCCGACAATGCCTTACAAG
	C2-0005B	CCCCATTCCCTACTCATCC	CACAGAAAGGTGCTCATGC
	CGR5501	TCTCTTTGCTGGTCACGAA	TGCCAAATACCCAAATCCAT
	CGR5503	GCTGCTTCCATGCCATTATT	GGGTGCTTGTAAAGTGAATG
	CGR5506	CAGCAACCACAATTGATCA	GAAGTTGCTGTTGGGAAGGA
	CGR5508	CAACTTCCGAGCTGGATT	TGATCGAGGAATGAAAGCAA
	CGR5645	GAGCGGAGAGTCCGGTT	CCCAAACGAATCAAAGATGG
	DC30003	AGGAGGGAAAGAGTGGTG	CCTCCTCACATCCAATCA
黄秋葵 Okra	DC30005	ATGAGAAACGGTGTGAA	TTGACCGAATACTCCCT
	DPL0840	GAGTCGTTGCCGCTGTTA	GCTACGACTCGATGTTACGG
	SHIN0733	GCTTGCCTTCGGTT	GGACTTCGTTATGAATGCTT
	SHIN0745	GCACCGAGTCCTATGCTC	GGACCCCAAACCTGTATTACACT
	CIR102	TAACAACTGGATGAGATGA	CATAACTGCAAAGGAGAA
	DC20067	ATGCAAACCATAAACATCT	TGGGTTGTTGCTATCT
	DPL0063	GTTCATACATATGGAGAGGCAGC	ATGCTTCTCACATGGCTACTCTT
	HeSSR002	CGCTGCTCCAGACATAACAA	TCTTCTCTCCGAACCTCCA
	HeSSR003	GGCGATCAAATTAGAAACCGAG	GTCACGCTGTAGCTCTCGAA
	HeSSR009	GAAGAACAAAGCAAGGCAAG	AACATCTCCAAGCTCCCTCA
	HeSSR011	TGCAGGCAAATCAACTGAAAG	GTTTCCATTGACTCGGGTA
	HeSSR017	ACTGCCACTAACAGCAATG	TGCGACAATATTCCAGCAG
	HeSSR020	TTCTCACTGCAGCAACAAGG	TGCCACTTCTCTGCCTCTTT
	HeSSR023	CAAGGAGACAATGCAGGGTT	ATTCGATAACCAAAGCTCCC
	HeSSR030	GAGATCAAGAACGTGTTGGCA	AATCTCGTTGGTTTCGGTG
	HeSSR033	TAAGAGGCGTGAAAGGAAGC	AAGCTCAACCTTACGGCAA
	HeSSR036	GTGGGTTCAAACCTTGGGTGAAG	CAGCAAGGTTATTACACTTTACA
	HeSSR037	ACGTCATCCTCATTAACGGC	TTCCTTCCGACAATTGAC
	HeSSR040	CGTTGAACGCTACCCATA	CCCGAAACCCACCTAACTCAA
	HeSSR041	GCGAATCTTTGGTATCGGA	ATGGATGATTGGTGGGATG
	HeSSR043	GCTGCAGCTAAACGCTTCT	CGTAGTCCATGAGGGCAAAT
	HeSSR046	GAATGGAAGCCAAGGATCAT	GGAATGAATTATGATGATGG

2 结果与分析

2.1 不同来源 SSR 引物在玫瑰茄中的扩增结果

本试验选用的 62 对 SSR 引物中，有 58 对能够成功扩增，有效扩增率为 93.5%，扩增产物片段大小为 70~400 bp（图 1），表明锦葵科植物的 SSR

标记在玫瑰茄中的通用性较好。能够扩增出稳定条带的有红麻 SSR 引物 HcEs0010 等 13 对，棉花 CGR5508 等 14 对，黄秋葵 HeSSR002 等 15 对，木槿 HA-1 等 16 对，其中黄秋葵 SSR 引物在玫瑰茄中的通用率最高（100%），木槿和棉花次之，通用率分别为 94.1%、和 93.3%，而红麻通用率最低，为 86.7%。



M: 100 bp ladder marker; 1: FAFU1; 2: H150; 3: 19FZ-74; 4: 白桃 K; 5: 漳州本地种; 6: MG5; 7: MG6; 8: 19FZ-76。引物 1: HA-1; 引物 2: HA-2; 引物 3: HA-3。

M: 100 bp ladder marker; 1: FAFU1; 2: H150; 3: 19FZ-74; 4: Baitao K; 5: Zhangzhou native cultivar; 6: MG5; 7: MG6; 8: 19FZ-76; Primer 1: HA-1; Primer 2: HA-2; Primer 3: HA-3.

图 1 3 对不同引物在 8 份玫瑰茄种质中的扩增结果

Fig. 1 Amplified 3 SSR primers for 8 roselle accessions

2.2 不同来源的 SSR 引物多态性

在 58 对能够成功扩增出条带的 SSR 引物中，有 48 对引物具有多态性，多态性引物比率为 82.8%（表 3），共扩增到 246 条有效条带，平均每对引物扩增出 4.2 条有效带。其中红麻 SSR 引物 HcEs0012 和棉花 SSR 引物 CGR5508、SHIN745 仅扩增出 2 条多态性条带，获得的条带数目最少，而棉花 SSR 引物 CGR5503 则扩增到 9 条有效条带。同时，所有扩增条带中的多态性条带有 239 条，平均每对有效引物扩增出 5.0 条多态性条带，多态位点比率为 50%~100%。另外，锦葵科不同作物间的 SSR 引物多态性比率及多态性条带的比率存在较大差异，其中棉花 SSR 引物的多态率为 86.7%，多态性条带比率为 93.8%；其次是木槿，有 14 对 SSR 引物具有多态性，多态性引物比率为 82.4%，而多态性条带比率达 100%，高于其

他 3 种作物；黄秋葵的多态性引物比率为 73.3%，多态性条带比率为 96.0%；引物多态率最低的是红麻，为 66.7%，而其多态性条带比率为 98.0%，仅次于木槿。

计算各引物的遗传参数及多态信息含量值（表 4），发现 48 对引物在 8 份玫瑰茄种质中共检测到 239 个多态位点，平均每对引物扩增出 5 个等位基因；多态信息含量 PIC (Polymorphism information content) 值为 0.110~0.843，其中引物多态信息含量最高的是来源于秋葵的 HeSSR041 (0.843)，最低的是来源于红麻的 HcES012 (0.110)。同时，来源于木槿的多态性 SSR 引物，其 PIC 平均值为 0.685，高于其他 3 种作物，说明木槿的 SSR 引物在玫瑰茄中多态性较高；其次是红麻 SSR，其 PIC 平均值为 0.571，最后是棉花和黄秋葵 SSR 引物，平均 PIC 值分别为 0.556 和 0.550。4 种锦葵科植物 SSR 引物的平均多态信息

表3 不同来源的SSR引物在玫瑰茄中的扩增情况

Table 3 Amplified SSR primers in roselle

标记来源 Origins	标记总数 Number of primers	引物通用率 Transferability/ %	多态性引物比率 Ratio of polymorphic primers/%	多态性条带比率 Ratio of polymorphic bands/%	有效条带数量范围 Number range of effective bands	平均扩增条带 Average amplified bands
木槿 Rosemallow	17	94.1	82.4	100	3~8	5.5
红麻 Kenaf	15	86.7	66.7	98.0	1~8	4.5
黄秋葵 kra	15	100	73.3	96.0	2~8	5
棉花 Cotton	15	93.3	86.7	93.8	1~9	5
总数 Total	62	93.5	82.8	97.2		

表4 8份玫瑰茄种质的遗传多样性信息

Table 4 Genetic diversity of 8 roselle accessions

来源 Origin	引物编号 Primer code	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	Shannon多样性指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	平均Nei's多样性指数 <i>H</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>
木槿 Rosemallow	HA-1	6	4.923	1.684	0.875	0.800	0.797	0.768
	HA-2	8	6.737	1.981	0.750	0.850	0.852	0.834
	HA-3	3	2.085	0.892	0.750	0.908	0.520	0.464
	HA-4	6	4.414	1.635	0.429	0.560	0.773	0.744
	HA-5	6	3.657	1.509	0.625	0.825	0.727	0.691
	HA-7	6	4.167	1.609	0.571	0.659	0.760	0.730
	HA-8	4	1.969	0.951	0.625	0.725	0.492	0.458
	HA-9	7	5.333	1.787	0.625	0.775	0.813	0.787
	HA-10	6	4.741	1.646	0.625	0.867	0.789	0.757
	HA-11	7	4.571	1.721	0.625	0.842	0.781	0.755
	HA-12	8	5.818	1.923	0.125	0.525	0.828	0.809
	HA-13	3	2.133	0.900	0.500	0.833	0.531	0.468
	HA-14	5	3.200	1.332	0.500	0.567	0.688	0.636
	HA-15	5	3.657	1.455	0.625	0.883	0.727	0.690
红麻 Kenaf	HcES011	4	2.612	1.157	0.375	0.675	0.617	0.572
	HcES012	2	1.133	0.234	0.400	0.844	0.117	0.110
	HcES014	8	5.565	1.890	0.125	0.125	0.820	0.799
	HcES015	6	4.741	1.663	0.625	0.875	0.789	0.759
	HcES020	5	2.000	1.037	0.875	0.842	0.500	0.474
	HcES041	6	2.370	1.247	0.375	0.533	0.578	0.553
	HcES060	7	6.533	1.909	0.375	0.658	0.847	0.828
	HcES070	5	2.000	1.037	0.625	0.617	0.500	0.474
	HcES075	5	4.000	1.494	0.286	0.912	0.750	0.712
	HcES087	3	2.032	0.831	0.500	0.533	0.508	0.428

续上表

来源 Origin	引物编号 Primer code	等位基因数	有效等位基因数	Shannon多样性指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	平均Nei's多样性指数 <i>H</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>
		<i>Na</i>	<i>Ne</i>					
	HeSSR002	3	2.246	0.882	1.000	0.592	0.555	0.456
	HeSSR003	5	3.122	1.354	0.000	0.800	0.680	0.641
	HeSSR009	6	2.032	1.124	0.625	0.542	0.508	0.489
	HeSSR017	3	1.684	0.736	0.250	0.233	0.406	0.371
	HeSSR020	8	5.765	1.909	0.000	0.000	0.827	0.806
黄秋葵 Okra	HeSSR023	3	1.684	0.736	0.714	0.890	0.406	0.371
	HeSSR033	4	2.941	1.221	0.000	0.433	0.660	0.610
	HeSSR040	4	3.600	1.330	0.500	0.433	0.722	0.671
	HeSSR041	8	7.111	2.014	0.500	0.450	0.859	0.843
	HeSSR043	3	1.343	0.509	0.000	0.788	0.255	0.240
	HeSSR046	3	2.723	1.043	0.375	0.917	0.633	0.556
	C20005B	5	4.000	1.494	0.286	0.275	0.750	0.712
	CGR5501	6	2.370	1.247	0.375	0.775	0.578	0.553
	CGR5503	9	7.000	2.069	0.625	0.617	0.857	0.842
	CGR5506	3	1.471	0.602	0.571	0.923	0.320	0.294
	CGR5508	2	1.882	0.662	0.125	0.342	0.469	0.359
	CGR564	4	2.579	1.091	0.250	0.800	0.612	0.541
棉花 Cotton	SHIN734	5	1.730	0.909	0.750	0.900	0.422	0.404
	SHIN745	2	1.280	0.377	0.750	0.800	0.219	0.195
	DC20067	7	3.368	1.560	0.200	0.733	0.703	0.678
	DC30005	7	6.400	1.895	0.750	0.500	0.844	0.824
	DPL0840	3	3.000	1.099	0.625	0.542	0.667	0.593
	CIR102	7	4.000	1.661	0.625	0.750	0.750	0.725
	C2-0004C	4	2.246	1.041	1.000	0.733	0.555	0.511
总计 Total		245	165.969	62.088	23.707	32.002	30.360	28.583
平均值 Average value		5	3.458	1.293	0.494	0.667	0.633	0.595

含量均大于 0.5, 表明这 4 种不同来源的 SSR 标记在玫瑰茄上均有较高的多态性。

2.3 基于 SSR 标记的玫瑰茄种质聚类分析

为了进一步验证所筛选锦葵科植物 SSR 引物在玫瑰茄上的通用性, 对 8 份玫瑰茄材料进行聚类分析(图 2)。由图 2 可知, 8 份玫瑰茄材料的遗传相似系数变幅为 0.23~0.58, 相似性较低, 表明它们之间亲缘关系较远, 遗传差异较大。在遗传相似系数为 0.46 处, 可将 8 份玫瑰茄种质分为两个类群, 其中第一类群包含其中 7 份种质, 第二类群仅有 1 份

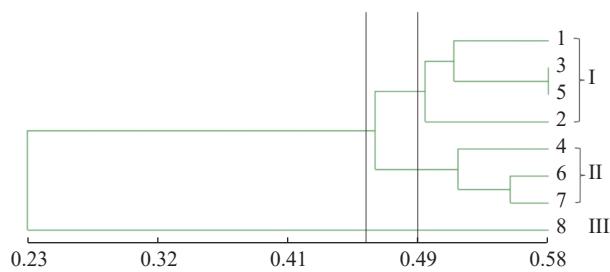


图 2 8 份玫瑰茄种质基于 SSR 标记的聚类分析
Fig. 2 SSR marker-based clustering on 8 roselle accessions

种质 19FZ-76。当以遗传相似系数为 0.49 划线时, 第一类群的 7 份种质又被划分为 2 个分支: 第一分支包括 4 份种质, 分别为 FAFU1、19FZ-74、漳州本地种和 H150; 第二分支包括白桃 K 以及来源地均为漳州的 MG5 和 MG6。上述结果表明, 锦葵科其他作物上开发的 SSR 标记, 用来对玫瑰茄进行遗传多样性分析是可行的。

3 讨论与结论

SSR 标记具有共显性遗传、重复性好、多态性高等优点, 因而成为植物种质资源遗传分析的重要标记, 广泛应用于主要作物的遗传图谱构建、基因定位、品种鉴定等研究中^[21]。目前 SSR 标记在主要作物上的开发利用进展较快, 但由于测序费用较昂贵、费时耗力等原因, 野生或栽培利用较少的小作物上序列信息缺乏, 因此 SSR 标记的开发利用受到了限制。因此, 研究物种之间 SSR 分子标记的通用性, 有利于丰富基因组信息较少的小作物的 SSR 数据库, 提高引物的利用效率, 降低引物的开发成本^[22], 从而为非模式作物的亲缘种属关系分析及遗传育种研究提供参考^[23]。研究表明, 利用 SSR 标记的跨物种转移性来提高引物的利用效率是一种有效的策略, 可以加速植物遗传多样性、亲缘关系以及近缘种内和近缘种间的物种起源与演化分析^[24]。

种质资源是农业科技创新和新品种选育的物质基础, 种质资源的收集、保护和遗传多样性评价对于优异资源的合理利用和种质创新具有重要意义^[25, 26]。与其他作物相比, 玫瑰茄分子生物学研究相对落后, SSR 标记开发和应用研究也尚未见报道, 因此限制了种质资源的鉴定、保护和利用。本研究利用锦葵科其他作物的 SSR 标记对玫瑰茄种质进行扩增, 发现其通用率达到 93.5%, 多态性引物比率为 82.8%, 效果较好, 尽管如此, 仍有极少数引物未得到有效扩增, 这可能与引物本身的特异性有关, 估计玫瑰茄染色体上不存在它们的基因位点。另外, 本研究的引物通用率低于红麻 EST-SSR 在木槿属上的通用率 (83%~99%)^[14], 可能原因是来源于功能基因的 EST 序列具有更高的保守性且突变频率低, 因此 EST-SSR 引物在不同木槿属植物中的转移率更高^[27]。此外, 方书生等^[13]利用棉花的 SSR 引物对红麻种质进行了多态性分析, 发现 53.5% 的引物得到有效扩增, 49.2% 的引物具有多态性。本研究的引物通用性及多态性比率比方书生等^[13]的高, 这可能由于红麻、木槿与玫瑰茄同为锦葵科木槿属的植物, 亲缘关系较近, 因此 SSR 引物的通用性也较高^[24]。

研究结果还发现, 来源于木槿的 SSR 引物在玫瑰茄上的通用率以及多态率均较高, 且平均 PIC 值高于其他 3 种锦葵科植物, 这与木槿和玫瑰茄的亲缘关系较近相关, 前人在棉花上的研究也表明了类似的观点^[28]。另外, 利用从甜瓜中开发的 SSR 标记对葫芦科作物进行分析, 发现在亲缘关系较近的黄瓜中通用率最高^[29], 而赵梦南等^[30]选用 70 对紫丁香 SSR 引物在 29 种木犀科植物中进行扩增, 发现在与紫丁香亲缘关系越近的植物中, 通用性比率越高^[30]。

引物扩增出的多态性条带不仅可以鉴定引物的有效性, 同时可以反映一个群体的遗传变异程度^[31]。本研究聚类结果表明, 19FZ-76 与其他 7 份材料遗传差异较大, 被单独区别开来, 这一结果与表型性状表现也一致, 该品种茎秆、叶片、花冠及果实颜色均为紫红色, 且株高较高, 株型与红麻类似, 与其他供试材料差异较大。此外, FAFU1 和 19FZ-76 之间的遗传相似系数最小, 表明这 2 个材料之间的亲缘关系较远, 这与田间性状表型一致, FAFU1 为早熟品种, 且叶片和副萼颜色均为绿色, 而 19FZ-76 现蕾较晚, 植株整体为紫红色。同时, 第 I 类群中, 19FZ-74 与漳州本地种的遗传相似系数最大 (0.58), 表明这 2 份种质的亲缘关系较近, 遗传差异相对较小。这一结果表明, 我国福建种植的玫瑰茄品种, 与东南亚的品种亲缘关系较近, 有可能从东南亚引种而来, 同时, 二者在农艺性状上的差异亦较小, 其茎秆、叶片及花萼颜色均相同, 株型也无明显差异。

综上所述, 利用 SSR 标记的种间可转移性对近缘种作物进行相关的遗传多样性分析是可行的。锦葵科作物的 SSR 标记可以在玫瑰茄上成功转移, 具有较理想的通用性, 这不仅可以提高现有 SSR 标记的利用效率, 同时还可以丰富玫瑰茄 SSR 标记的数量, 为玫瑰茄种质鉴定、遗传图谱构建、分子标记辅助育种等相关研究提供有效工具, 这对于基因组尚未破译、分子生物学研究相对滞后的玫瑰茄尤为重要。

参考文献:

- [1] 李洪祥, 姜保平, 肖伟, 等. 玫瑰茄近十年的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2017, 19 (4): 587~593,598.
- [2] LI H X, JIANG B P, XIAO W, et al. A comprehensive review on *Hibiscus sabdariffa* L [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2017, 19 (4) : 587~593,598. (in Chinese)
- [3] 怀志萍. 玫瑰茄 [J]. 作物杂志, 1986 (5): 21.
- [4] HUAI Z P. *Hibiscus sabdariffa* [J]. *Crops*, 1986 (5) : 21. (in Chinese)

- Chinese)
- [3] SALAMI S O, AFOLAYAN A J. Evaluation of nutritional and elemental compositions of green and red cultivars of Roselle: *Hibiscus sabdariffa* L [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 1030.
- [4] 李玉珠, 杜木英, 何瑞, 等. 玫瑰茄花萼生理活性成分及其开发利用研究进展 [J]. *中国调味品*, 2017, 42 (6): 170–174.
- LI Y Z, DU M Y, HE R, et al. Research progress on physiological active components and utilization of Roselle calyces [J]. *China Condiment*, 2017, 42 (6): 170–174. (in Chinese)
- [5] 陈沁雯, 于亚辉, 刘斌雄, 等. 玫瑰茄花萼的生物活性及开发利用研究进展 [J]. *安徽农学通报*, 2020, 26 (6): 49–53.
- CHEN Q W, YU Y H, LIU B X, et al. Research progress on pharmacological effects of Roselle Calyx and its development and utilization [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2020, 26 (6): 49–53. (in Chinese)
- [6] 李秀芬, 朱建军, 张建锋, 等. 玫瑰茄引种栽培与应用研究进展 [J]. *上海农业学报*, 2015, 31 (5): 136–139.
- LI X F, ZHU J J, ZHANG J F, et al. Reviews of Roselle introduction cultivation and application [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2015, 31 (5): 136–139. (in Chinese)
- [7] KAPOOR M, MAWAL P, SHARMA V, et al. Analysis of genetic diversity and population structure in *Asparagus* species using SSR markers [J]. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2020, 18 (1): 50.
- [8] WANG J H, ZHANG Y W, CHENG X Z, et al. Construction of genetic map and identification of QTLs related to Ag-ronomic traits in mung bean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43 (7): 1096.
- [9] 叶卫军, 陈圣男, 杨勇, 等. 绿豆SSR标记的开发及遗传多样性分析 [J]. *作物学报*, 2019, 45 (8): 1176–1188.
- YE W J, CHEN S N, YANG Y, et al. Development of SSR markers and genetic diversity analysis in mung bean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45 (8): 1176–1188. (in Chinese)
- [10] LIN Y S, KUAN C S, WENG I S, et al. Cultivar identification and genetic relationship of pineapple (*Ananas comosus*) cultivars using SSR markers [J]. *Genetics and Molecular Research:GMR*, 2015, 14 (4): 15035–15043.
- [11] LU X, ADEDZE Y M N, CHOFONG G N, et al. Identification of high-efficiency SSR markers for assessing watermelon genetic purity [J]. *Journal of Genetics*, 2018, 97 (5): 1295–1306.
- [12] BOMBONATO J R, BONATELLI I A S, SILVA G A R, et al. Cross-Genera SSR transferability in cacti revealed by a case study using *Cereus* (Cereeae, Cactaceae) [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2019, 42 (1): 87–94.
- [13] 方书生, 谢雄峰, 祁建民, 等. 棉花SSR标记在红麻中的通用性 [J]. *热带作物学报*, 2018, 39 (7): 1373–1382.
- FANG S S, XIE X F, QI J M, et al. Universality of simple sequence repeat(SSR) markers from cotton(*Gossypium hirsutum*) to kenaf(*Hibiscus cannabinus*) [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39 (7): 1373–1382. (in Chinese)
- [14] KIM J M, LYU J I, LEE M K, et al. Cross-species transferability of EST-SSR markers derived from the transcriptome of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and their application to genus *Hibiscus* [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2019, 66 (7): 1543–1556.
- [15] PRATIK S, PRAMOD K P, SWAGATA G, et al. Confamiliar transferability of simple sequence repeat (SSR) markers from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and jute (*Corchorus olitorius* L.) to twenty two Malvaceous species [J]. *3 Biotech*, 2016, 6 (1): 65.
- [16] WAN X B, LI D X, XU Y, et al. Development and polymorphism evaluation of EST-SSR markers in kenaf [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43 (8): 1170.
- [17] 李永平, 刘建汀, 陈敏氡, 等. 利用黄秋葵转录组信息挖掘SSR标记及用于种质分析 [J]. *园艺学报*, 2018, 45 (3): 579–590.
- LI Y P, LIU J T, CHEN M D, et al. SSR markers excavation and germplasm analysis using the transcriptome information of *Hibiscus esculentus* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 (3): 579–590. (in Chinese)
- [18] ZHANG L, SUN W B, WANG Z L, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hibiscus aridicola* (Malvaceae), an endangered plant endemic to the dry-hot valleys of Jinsha River in Southwest China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12 (9): 5698–5704.
- [19] 徐建堂, 祁建民, 方平平, 等. CTAB法提取红麻总DNA技术优化与ISSR和SRAP扩增效果 [J]. *中国麻业科学*, 2007, 29 (4): 179–183.
- XU J T, QI J M, FANG P P, et al. Optimized CTAB protocol for extracting genomic DNA from kenaf and improved PCR amplifications of ISSR and SRAP [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2007, 29 (4): 179–183. (in Chinese)
- [20] FAN L, ZHANG M Y, LIU Q Z, et al. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31 (6): 1271–1282.
- [21] 卓蕾, 向成丽, 肖杰, 等. SSR标记在植物种质资源鉴定的应用进展 [J]. *现代园艺*, 2021, 44 (15): 9–11.
- ZHUO L, XIANG C L, XIAO J, et al. Application progress of SSR markers in identification of plant germplasm resources [J]. *Contemporary Horticulture*, 2021, 44 (15): 9–11. (in Chinese)
- [22] 钟敏, 程须珍, 王丽侠, 等. 绿豆基因组SSR引物在豇豆属作物中的通用性 [J]. *作物学报*, 2012, 38 (2): 223–230.
- ZHONG M, CHENG X Z, WANG L X, et al. Transferability of mungbean genomic-SSR markers in other *Vigna* species [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38 (2): 223–230. (in Chinese)
- [23] 张燕梅, 李俊峰, 麦志伟, 等. 剑麻EST-SSR在丝兰麻和中美麻中的通用性分析 [J]. *热带作物学报*, 2021, 42 (7): 1824–1830.
- ZHANG Y M, LI J F, LU Z W, et al. Transferability analysis of sisal EST-SSR markers in *Yucca* and *Furcraea* vent [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42 (7): 1824–1830. (in Chinese)
- [24] LI H, LI D F, CHEN A G, et al. Characterization of the kenaf (*Hibiscus cannabinus*) global transcriptome using illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers [J]. *PLOS One*, 2016, 11 (3): e0150548.
- [25] 孟珊, 狄佳春, 苏彩霞, 等. 江苏省扁豆地方种质资源遗传多样性评价 [J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (5): 1258–1272.

- MENG S, DI J C, SU C X, et al. Genetic diversity analysis of hyacinth bean landraces collected from Jiangsu Province [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 (5) : 1258–1272. (in Chinese)
- [26] 王振江, 罗国庆, 戴凡炜, 等. 基于8个农艺性状的569份果桑种质遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2021, 48 (12) : 2375–2384.
- WANG Z J, LUO G Q, DAI F W, et al. Genetic diversity of 569 fruit mulberry germplasm resources based on eight agronomic traits [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48 (12) : 2375–2384. (in Chinese)
- [27] 贺润丽, 樊杰, 平莉莉, 等. 大豆基因组SSR和EST-SSR在黄芪中的通用性分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (5) : 994–998.
- HE R L, FAN J, PING L L, et al. Transferability of soybean gemonic-SSR and EST-SSR markers in *Astragalus* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13 (5) : 994–998. (in Chinese)
- [28] 郑丽珊, 袁有禄, 王静毅, 等. 棉花SSR分子标记在香蕉中通用性的研究 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5 (5) : 667–672.
- ZHENG L S, YUAN Y L, WANG J Y, et al. Transferability of cotton SSR marker to *Musa* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5 (5) : 667–672. (in Chinese)
- [29] 宋金亮, 杨路明, 郭禄芹, 等. 甜瓜SSR标记在葫芦科不同作物间的通用性分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16 (12) : 3980–3988.
- SONG J L, YANG L M, GUO L Q, et al. Generality analysis of melon SSR markers in different cucurbit crops [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16 (12) : 3980–3988. (in Chinese)
- [30] 赵梦南, 何芮庆, 周宁, 等. 紫丁香EST-SSR标记在木犀科植物中通用性及亲缘关系分析 [J]. 分子植物育种, 2021-09-23, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210918.0603.006.html>.
- ZHAO M N, HE R Q, ZHOU N, et al. Analysis of the transferability and genetic relationship of EST-SSR markers of *Syringa oblata* in Oleaceae[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021-09-23, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210918.0603.006.html>.(in Chinese)
- [31] 王其鹏, 王丽乔, 张巍巍, 等. 洋葱EST-SSR标记在大葱中的通用性及多态性分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46 (23) : 45–49.
- WANG Q P, WANG L Q, ZHANG W W, et al. Generality and polymorphism analysis of onion EST-SSR markers in Welsh onion [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46 (23) : 45–49. (in Chinese)

(责任编辑: 黄爱萍)