

菠菜种质遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析

吴娅妮^{1,2}, 康俊根¹, 王文科², 孟淑春^{1,*}

(¹北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097; ²山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004)

摘要: 利用 AFLP 标记技术对 110 份来源不同的菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 种质进行遗传多样性分析, 结果表明, 筛选出的 20 对 *EcoR* I/*Mse* I 引物组合共扩增出 882 条带, 其中 208 条多态性条带, 多态性比率 23.6%; 种质间的遗传相似系数为 0.64 ~ 0.87, 不同来源组群的 Nei's 遗传多样性指数范围为 0.1887 ~ 0.2501, 总体为 0.2830, Shannon 信息指数范围为 0.2789 ~ 0.3793, 总体为 0.4337。种质间基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析、主坐标分析与组群间基于 Nei's 遗传距离的聚类分析结果基本相同, 与地理来源有很高的一致性。全部供试种质可分为两类, 欧美、西亚、东亚及中国北方种质聚为一类, 部分日本种质和中国的南方种质聚为另一类, AFLP 标记能很好地从分子水平揭示菠菜资源的亲缘关系。由亲缘关系推测中国的南、北方菠菜种质可能有着不同的起源。

关键词: 菠菜; 遗传多样性; 亲缘关系; AFLP

中图分类号: S 636.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 05-0913-11

Genetic Diversity and Relationship of Spinach Germplasm Revealed by AFLPs

WU Ya-ni^{1,2}, KANG Jun-gen¹, WANG Wen-ke², and MENG Shu-chun^{1,*}

(¹Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China; ²College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were employed to assess the genetic diversity and relationship of 110 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasms from different geographical origins. Among the 882 polymorphic bands obtained from 20 selective primer pairs, 228 (23.6%) of them was polymorphic. The genetic similarity ranged from 0.64 to 0.87 for all germplasms accessions. Nei's gene diversity index ranged from 0.1887 to 0.2501 for different populations, with the total value of 0.2830. Shannon information index varied from 0.2789 to 0.3793, with the total value of 0.4337. UPGMA Cluster suggested genetic relationship of all the accessions were significantly related to their geographical origins. The results of PCA, UPGMA and based Nei's gene diversity of populations clustering analysis exhibited a good consistency with UPGMA, and were also consistent with geographical

收稿日期: 2013-01-15; 修回日期: 2013-04-12

基金项目: 北京市科技新星计划项目(2008B37); 北京市科委重大课题(D131100000413001); 国家科技支撑计划课题(2012BAK26B03); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: mengshuchun@nerv.org)

origins. All the accessions were classified and clustered into two major groups. Group 1 was comprised of the spinach originated in European, America, West Asia, East Asia and Northern China, whereas group 2 was comprised of the spinach originated in the Southern China and Japan. The results suggested that Northern and Southern Chinese spinach population may have different origins.

Key words: *Spinacia oleracea* L.; genetic diversity; genetic relationship; AFLP

菠菜原产于伊朗（沈春梅 等，2008），唐朝时传入中国（袁玉伟，2008）。TRAP、RAPD 等技术在菠菜种质资源的遗传多样性分析和种质鉴定方面已有报道（Hu et al., 2007; 张南, 2007），菠菜种质抗病及耐寒性鉴定也取得了一定成果（Brian & Irish, 2004; 张南, 2007）。但对菠菜的基础性研究相对薄弱，进一步开展菠菜种质资源遗传多样性评价和亲缘关系的研究，对菠菜种质创新利用和新品种选育具有重要意义。

AFLP 技术是由荷兰科学家 Vos 等（1995）发展并首先用于植物分子生物学的研究。该技术综合了 RFLP 和 RAPD 技术的优点，现已在蔬菜作物的亲缘关系研究（张天明 等，2006; 杨福强 等，2009）、指纹图谱构建（宋顺华和郑晓鹰，2006; 苏永涛 等，2010）、目的基因定位（Luige & Concetta, 2007; 袁鹤 等，2009）、分子标记辅助育种（姜明 等，2011）等方面都得到了广泛应用。Brian 和 Irish（2004）利用 AFLP 技术对来自美国农业部收集的 49 份地理来源不同的菠菜种质进行遗传多样性分析，但收集到的种质资源有限，尚不能说明中国菠菜种质资源间的遗传多样性特点及亲缘进化关系。本研究中通过 AFLP 技术，在前人研究的基础上对收集的 110 份来源不同的菠菜种质材料进行种质间的遗传多样性及亲缘关系分析，旨在揭示菠菜种质资源遗传多样性与地理分布特点和群体间的遗传关系，从而为中国菠菜种质资源的收集、保护和新品种选育提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料于 2011 年采集于北京市农林科学院蔬菜研究中心四季青实验农场，材料来自于 Leibniz - 德国遗传植物与作物育种研究所、中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家种质资源库和北京市农林科学院蔬菜研究中心种质资源库，共 110 份种质材料（表 1）。每个品种随机选取 5 棵植株，取其叶片剪碎后均匀混合，于 - 80 °C 保存备用。

表 1 供试材料
Table 1 Materials used in the experiment

编号 No.	品种 Cultivar	来源地 Origin	组群 Groups	编号 No.	品种 Cultivar	来源地 Origin	组群 Groups
1	Juliana	德国 Germany	ME	56	Viroflay	德国 Germany	ME
2	Munsterlander	德国 Germany	ME	57	spinagh	伊拉克 Iraq	WA
3	Scharfsamiger tblatttriger	德国 Germany	ME	58	Tenjinmaru	日本 Japan	EA
4	Konig von Danemark	德国 Germany	ME	59	Spinacio Riccio d'Asti	意大利 Italy	SE
5	Matador	德国 Germany	ME	60	Spinacio Riccio d'Asti	意大利 Italy	SE
6	Bianka	德国 Germany	ME		Lento a Montare		
7	Spinacio gigante d inverno	意大利 Italy	SE	61	尖叶菠菜 Jianyebocai	安徽 Anhui	SC
8	Ispanachi(georgia)	美国 America	A	62	圆叶菠菜 Yuanyebocai	安徽 Anhui	SC
9	Spanacia selvatica	意大利 Italy	SE	63	尖叶菠菜 Jianyebocai	四川 Sichuan	SC
				64	小尖叶菠菜	四川 Sichuan	SC
					Xiaojianyebocai		
10	Spinacia a foglia larga	意大利 Italy	SE	65	大尖叶菠菜 Dajianyebocai	四川 Sichuan	SC

续表 1

编号 No.	品种 Cultivar	来源地 Origin	组群 Groups	编号 No.	品种 Cultivar	来源地 Origin	组群 Groups
11	Matador	德国 Germany	ME	66	尖叶菠菜 Jianyebocai	四川 Sichuan	SC
12	Rheinischer Riesen	德国 Germany	ME	67	武平菠菜 Wupingbocai	福建 Fujian	SC
13	Spinat-1	德国 Germany	ME	68	台湾大叶菠菜 Taiwandayebocai	台湾 Taiwan	SC
14	ZIRNOLISTNYI	俄罗斯 Russia	EE	69	Diamond	英国 England	WE
15	Spinat-2	土耳其 Turkey	WA	70	细叶角菜 Xiyejiaocai	广东 Guangdong	SC
16	MONTAKU	德国 Germany	ME	71	迟花黑叶菠菜 Chihuaheiyebocai	广东 Guangdong	SC
17	Spinat-3	土耳其 Turkey	WA	72	黑叶菠菜 Heiyebocai	广东 Guangdong	SC
18	MASTER	德国 Germany	ME	73	兴义菠菜 Xingyibocai	贵州 Guizhou	SC
19	Spinat-4	土耳其 Turkey	WA	74	慈姑叶菠菜 Ciguyebocai	贵州 Guizhou	SC
20	Spinat-5	土耳其 Turkey	WA	75	鹿色圆叶菠菜 Luseyuanyebocai	河南 Henan	NC
21	CONDOR	德国 Germany	ME	76	汝阳大圆叶 Ruyangdayuanye	河南 Henan	NC
22	Spinat-6	土耳其 Turkey	WA	77	登高菠菜 Denggaobocai	湖北 Hubei	SC
23	Spinat-7	土耳其 Turkey	WA	78	小菠菜 Xiaobocai	湖北 Hubei	SC
24	Spinat-8	土耳其 Turkey	WA	79	扯根菜 Chegencai	湖北 Hubei	SC
25	MONATOL	德国 Germany	ME	80	大叶菠菜 Dayebocai	湖北 Hubei	SC
26	ASTA	德国 Germany	ME	81	尖叶菠菜 Jianyebocai	湖南 Hunan	SC
27	WIREMONA	德国 Germany	ME	82	二菠菜 Erbocai	湖南 Hunan	SC
28	JAGUAR	德国 Germany	ME	83	黎头菠菜 Litoubocai	湖南 Hunan	SC
29	MUEMA	德国 Germany	ME	84	荷兰圆叶-2 Helanyuanye-1	荷兰 Netherlands	WE
30	STALITA	德国 Germany	ME	85	荷兰圆叶-1 Helanyuanye-2	荷兰 Netherlands	WE
31	RANCHO	荷兰 Netherlands	WE	86	日本菠菜 Ribenbocai	内蒙 Neimeng	NC
32	ACELGA	西班牙 Spain	SE	87	火菠菜 Huobocai	内蒙 Neimeng	NC
33	Spinat-9	土耳其 Turkey	WA	88	冬菠菜 Dongbocai	河北 Hebei	NC
34	ARAVANT	德国 Germany	ME	89	BLOOMSDLE LONG STANDING	美国 America	A
35	LARINA	德国 Germany	ME	90	Medania	英国 England	WE
36	MOVERA	荷兰 Netherlands	WE	91	三元叶 Sanyuanye	四川 Sichuan	SC
37	NORVETO	荷兰 Netherlands	WE	92	法莲草 Faliancao	日本 Japan	EA
38	LOCAL	俄罗斯 Russia	EE	93	日本菠菜 I Ribenbocai I	日本 Japan	EA
39	CONSISTA	德国 Germany	ME	94	AJI 王菠菜 AJI wangbocai	日本 Japan	EA
40	Resistant	美国 America	A	95	西洋大叶 Xiyangdaye	日本 Japan	EA
41	Matador	德国 Germany	ME	96	Wobli	荷兰 Netherlands	WE
42	Virginia Savy Blight Resistant	美国 America	A	97	SPANAC SMARALD	荷兰 Netherlands	WE
43	Quedlinburger Fortschritt	德国 Germany	ME	98	新仙台 Xinxiantai	日本 Japan	EA
44	Osnabrucker Rundsamiger Munsterlander	德国 Germany	ME	99	GIGANTE DINVERNO	意大利 Italy	SE
45	Breusteds Spika	德国 Germany	ME	100	Okame	日本 Japan	EA
46	Hilds Lorelei	德国 Germany	ME	101	Makikori	日本 Japan	EA
47	Inhoffens Rhenania	德国 Germany	ME	102	浙江全能菠菜 Zhejiangquannengbocai	浙江 Zhejiang	SC
48	Garant	德国 Germany	ME	103	绍兴尖叶菠菜 Shaoxingjianyebocai	浙江 Zhejiang	SC
49	Bovri	荷兰 Netherlands	WE	104	尖叶菠菜 Jianyebocai	安徽 Anhui	SC
50	Universal	德国 Germany	ME	105	尖叶菠菜 Jianyebocai	陕西 Shanxi	NC
51	Onas Eszkimo	匈牙利 Hungary	ME	106	圆叶菠菜 Yuanyebocai	甘肃 Gansu	NC
52	Eszkimo	匈牙利 Hungary	ME	107	日本大叶菠菜 Ribendayebocai	山东 Shandong	NC
53	Ispolinskij	俄罗斯 Russia	EE	108	西安大叶 Xi'andaye	陕西 Shanxi	NC
54	Viking	意大利 Italy	SE	109	Mazerani	日本 Japan	EA
55	Kasi Jong	朝鲜 Korea Democratic Republic	EA	110	韩国紫叶柄菠菜 Hanguoziyebingbocai	韩国 Republic of Korea	EA

注: SC: 中国南方组群; NC: 中国北方组群; EA: 东亚组群; WA: 西亚组群; EE: 东欧组群; ME: 中欧组群; WE: 西欧组群; SE: 南欧组群; A: 美国组群。

Note: SC: Southern China population; NC: Northern China population; EA: Eastern Asia population; WA: Western Asia population; EE: Eastern Europe population; ME: Middle Europe population; WE: Western Europe population; SE: Southern Europe population; A: America population.

110 份种质材料根据来源地不同分为 9 个组群：中国南方组群（SC），包括来源地为中国安徽、四川、福建、台湾、广东、贵州、湖北、湖南、浙江 9 个南方省份的 24 份种质；中国北方组群（NC），包括来源地为中国甘肃、河南、内蒙、河北、陕西、山东 6 个北方省份的 9 份种质；东亚组群（EA），包括朝鲜、韩国、日本的 11 份种质；西亚组群（WA），包括伊拉克和土耳其的 9 份种质；东欧组群（EE），包括来自俄罗斯的 3 份种质；中欧组群（ME），包括来源地为德国和匈牙利的 32 份种质；西欧组群（WE），包括来源地为荷兰和英国的 10 份种质；南欧组群（SE），包括来源地为意大利和西班牙的 8 份种质；美国组群（A），包括 4 份来源地为美国的种质。

1.2 样品 DNA 的提取和 AFLP-PCR 的扩增

利用优化后的菠菜 AFLP 反应体系对 110 份菠菜种质遗传多样性进行分析。DNA 采用改良的 CTAB 法提取（Doyle, 1991），即在 CTAB 提取缓冲液中加入 β -巯基乙醇和 PVP 用以除去酚和多糖类物质，提取出的 DNA 经紫外分光光度法检测浓度和纯度。提取出的菠菜基因组 DNA 利用 *EcoR* I / *Mse* I 限制性内切酶组合进行双酶切，酶切连接采用“一步法”（郑先云 等, 2003）完成，反应条件为 37 °C 酶切 5 h, 16 °C 连接 6 h, 产物直接用于预扩增。预扩增引物采用 E + A/M + A 引物组合，预扩增体系浓度 dNTPs 0.2 mmol · L⁻¹, Mg²⁺ 1.5 mmol · L⁻¹, 预扩增产物稀释 200 倍用于选择性扩增。利用筛选出的 20 对引物对 110 份菠菜种质进行选择扩增，扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，银染显示结果。

1.3 数据处理和分析

根据 AFLP 扩增条带的有无，统计为 1、0 矩阵。依据每对引物扩增出的总条带及多态性条带数目，计算多态性百分率。110 份菠菜供试种质材料的 Nei's (Nei, 1973) 遗传多样性指数 (H_e)、Shannon 信息指数 (I)、群体间遗传分化系数 (G_{ST})、基因流 (N_m) 及遗传距离 (D) 等参数采用 POPGENE 1.32 软件进行数据的统计分析。利用 NTSYSpc2.10 软件进行种质间的 UPGMA 聚类分析、主坐标分析和基于 Nei's 遗传距离的组群间的聚类分析。

2 结果与分析

2.1 不同 AFLP 引物组合扩增结果

从 256 对 *EcoR* I / *Mse* I 随机引物组合中筛选出 20 对条带清晰、多态性强且重复性好的引物组合，对 110 份不同地理来源的菠菜种质 DNA 进行扩增与分析，结果见表 2。

20 对引物组合共扩增出 882 条带，其中多态性条带 208 条，多态性条带占总带数的比率为 23.6%。不同引物组合扩增效率有所不同，引物组合 ACC/AGG 效率最高，多态性位点百分率为 41.9%，引物组合 ATG/AAG 最低，多态性位点百分率为 13.5%；平均每对引物能够扩增出 44.1 条带，多态性条带 10.4 条。由此可知，在菠菜种质遗传多样性的检测中，AFLP 是非常有效的工具。

2.2 菠菜种质的遗传多样性

利用 POPGENE1.32 软件计算各位点的 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数等参数。结果表明：110 份菠菜种质所属的 9 个组群间的遗传分化系数为 0.1794，基因流为 2.2871，说明不同组群间存在一定程度的遗传分化。110 份菠菜种质的平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.2833，平均 Shannon 信息指数为 0.4337，分析还发现，各位点遗传多样性存在不同程度的差别，Nei's 遗传多样性指数最大值为 0.4990，最小值为 0.0088；Shannon 信息指数最大值是 0.6931，最小值是 0.0282，说明本研

究供试种质间存在一定程度的遗传变异。

各组群的多态位点百分率、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数也有所不同，变化趋势基本保持一致。多态位点百分率分布范围为 49.64% ~ 83.70%，Nei's 遗传多样性指数分布范围为 0.1887 ~ 0.2501，Shannon 信息指数分布范围为 0.2789 ~ 0.3793（表 3）。其中，中国南方组群的多态位点百分率和 Shannon 信息指数在供试组群中均为最高值，其 Nei's 遗传多样性指数也仅次于中国北方组群，为 0.2487。东欧组群的多态位点百分率、Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数均为供试组群中的最低值。供试组群间，3 个多样性检测指标之间有很高的相关性，Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数的相关系数最高为 0.992，多态位点百分率和 Shannon 信息指数的相关系数次之为 0.8953，多态位点百分率和 Nei's 遗传多样性指数的相关系数相对较低为 0.8456。

表 2 菠菜 AFLP 分析结果
Table 2 Results of AFLP analysis of *Spinacia oleracea* L.

<i>Eco</i> R I 引物 Primer <i>Eco</i> R I	<i>Mse</i> I 引物 Primer <i>Mse</i> I	扩增条带数 Number of amplified bands	多态带数 Number of polymorphic bands	多态位点百分率/% Percent of polymorphic loci
E-ACT	M-ACT	62	11	17.7
E-AGT	M-ACC	35	8	22.9
E-ATC	M-AAA	58	17	29.3
E-ATC	M-ATG	29	6	20.7
E-ATG	M-AAG	52	7	13.5
E-ATG	M-ACC	45	12	26.7
E-ATG	M-ACG	31	8	25.8
E-ATG	M-ACT	65	11	16.9
E-ATG	M-ATA	59	8	13.6
E-ATT	M-ACT	35	7	20.0
E-AAC	M-AGG	41	12	29.3
E-AAC	M-ATC	38	8	21.1
E-AAG	M-ACG	38	6	15.8
E-AAG	M-ATA	45	8	17.8
E-AAT	M-ACC	48	10	20.8
E-ACC	M-AAA	46	15	32.6
E-ACC	M-ACC	40	11	27.5
E-ACC	M-AGG	43	18	41.9
E-ACG	M-AGA	32	11	34.4
E-ACT	M-ACC	40	14	35.0
总数 Total		882	208	
平均 Mean		44.1	10.4	23.6

表 3 菠菜组群间的多样性分析
Table 3 Diversity measures among spinach groups

代码 Code	组群名称 Name of groups	多态位点百分率/% Polymorphic loci	Nei's 遗传多样性指数 Nei's gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon information index
SC	中国南方组群 Southern China population	83.70	0.2487	0.3793
NC	中国北方组群 Northern China population	73.55	0.2501	0.3708
EA	东亚组群 Eastern Asia population	72.46	0.2474	0.3729
WA	西亚组群 Western Asia population	66.67	0.2305	0.3457
EE	东欧组群 Eastern Europe population	49.64	0.1887	0.2789
ME	中欧组群 Middle Europe population	79.71	0.2382	0.3624
WE	西欧组群 Western Europe population	59.06	0.2000	0.3004
SE	南欧组群 Southern Europe population	64.86	0.2272	0.3394
A	美国组群 America population	55.07	0.2022	0.3001
	全体 Total	99.28	0.2830	0.4337

2.3 菠菜种质间的亲缘关系

利用 NTSYSpc2.10 软件分析 110 份菠菜种质两两间的遗传相似系数在 0.64~0.87 之间。其中, 19 号 ‘Spinat-4’ 和 23 号 ‘Spinat-7’ 种质之间的遗传相似系数值最大, 为 0.867, 表明在供试种质材料中二者亲缘关系最近, 为相似品种, 二者来源地均为土耳其, 且形态学观察都为近圆形叶片、叶面光滑、无缺刻; 2 号 ‘Munsterlander’ 和 83 号 ‘黎头菠菜’ 种质之间的遗传相似系数值最小, 为 0.643, 表明二者在供试种质材料中的亲缘关系最远, 种质来源地分别为德国和中国的湖南省, 地理来源不同, 且形态学观察叶型、株高, 叶柄长度等有较大差异。

基于供试群体间的遗传相似系数, 对 110 份菠菜种质进行 UPGMA 聚类分析。从图 1 可知, 在相似系数为 0.68 处可将供试的菠菜种质材料分为两大类。

第 1 大类包括 76 份菠菜种质, 主要以欧美种质、西亚种质及中国北方种质为主。在相似系数为 0.71 处, 可将这部分种质材料分为两个亚类。第 1 亚类包括 70 份种质, 可进一步分为 6 个组。

(1) 组, 6 份种质, 主要为意大利种质和德国种质。(2) 组, 51 份种质, 该组种质分别聚为两小类: 第一小类 41 份种质, 包括 19 份德国种质、5 份土耳其种质、1 份英国种质、7 份荷兰种质、3 份日本种质、2 份匈牙利种质、3 份意大利种质和 1 份西班牙种质, 其中来源地为德国、荷兰、英国、匈牙利、日本的 29 份种质间亲缘关系较近聚在一起, 除日本外, 这些国家地处中欧、西欧, 地理位置相互交错, 其余种质亲缘关系较近聚在一起, 这部分种质来源地主要是土耳其、意大利、荷兰、西班牙; 第二小类包括 10 份种质, 来源地分别为德国、意大利、美国、甘肃、山东及河南, 其中 3 份中国北方种质亲缘关系密切。(3) 组, 来源于荷兰、陕西、德国的 3 份种质。(4) 组, 编号为 38、110 的俄罗斯、韩国种质。(5) 组, 来源地分别为俄罗斯、德国的 3 份种质。(6) 组, 来源地为美国, 河南、内蒙、德国的 5 份种质。该亚类中 (1)、(2)、(3) 组亲缘关系较近, 以欧洲种质和中国北方种质为主, (4)、(5) 组主要为来自俄罗斯和韩国的种质, (6) 组以美国种质为主。第 2 亚类包括 6 份种质, 种质编号分别为 3、20、22、15、57、69, 种质来源地分别为德国、土耳其、土耳其、土耳其、伊拉克和英国, 该亚类大部分为西亚种质。

第 2 大类包括 34 份菠菜种质, 主要以中国南方种质和部分日本种质为主。在相似系数为 0.66 处可将其分为两个亚类。第 1 亚类包括 27 份种质, 进一步可细分为 10 个组。(1) 组, 编号为 55 的朝鲜种质。(2) 组, 编号为 58 的日本种质。(3) 组, 编号为 61、62、66 的 3 份种质, 种质来源地分别为安徽、安徽、四川。(4) 组, 包括 12 份种质, 种质来源地为广东、四川、浙江、福建、湖北、安徽、贵州、湖南、湖北, 均为中国的南方省份。(5) 组, 编号为 87、103、88 的 3 份种质, 种质来源地分别为内蒙、浙江、河北。(6) 组, 编号为 82 的湖南品种。(7) 组, 编号为 70、72 的 2 份广东种质。(8) 组, 编号为 77 的湖北种质。(9) 组, 编号为 74 的贵州种质。(10) 组, 编号为 68、80 的 2 份种质, 种质来源地分别为台湾、湖北。除第 (1)、(2)、(5) 组中编号为 55、58、87、88 的 4 份种质外, 其余小组种质来源地均为中国南方, 该亚类以中国南方种质为主。第 2 亚类包括 7 份种质材料, 编号分别为 94、92、105、93、100、81、98, 其中除 105 为湖南种质和 81 为陕西种质外, 其余为日本种质, 该亚类以日本品种为主。

从 UPGMA 聚类分析中可看出, 大部分的供试种质能按照地理来源聚类, 除中国和日本外, 大部分引自同一国家的种质具有较近的亲缘关系。中国北方种质与来自欧洲国家的种质聚在一起, 亲缘关系密切, 中国南方种质与部分日本种质亲缘关系较近, 聚在一起。日本种质在两大类中均有分布。

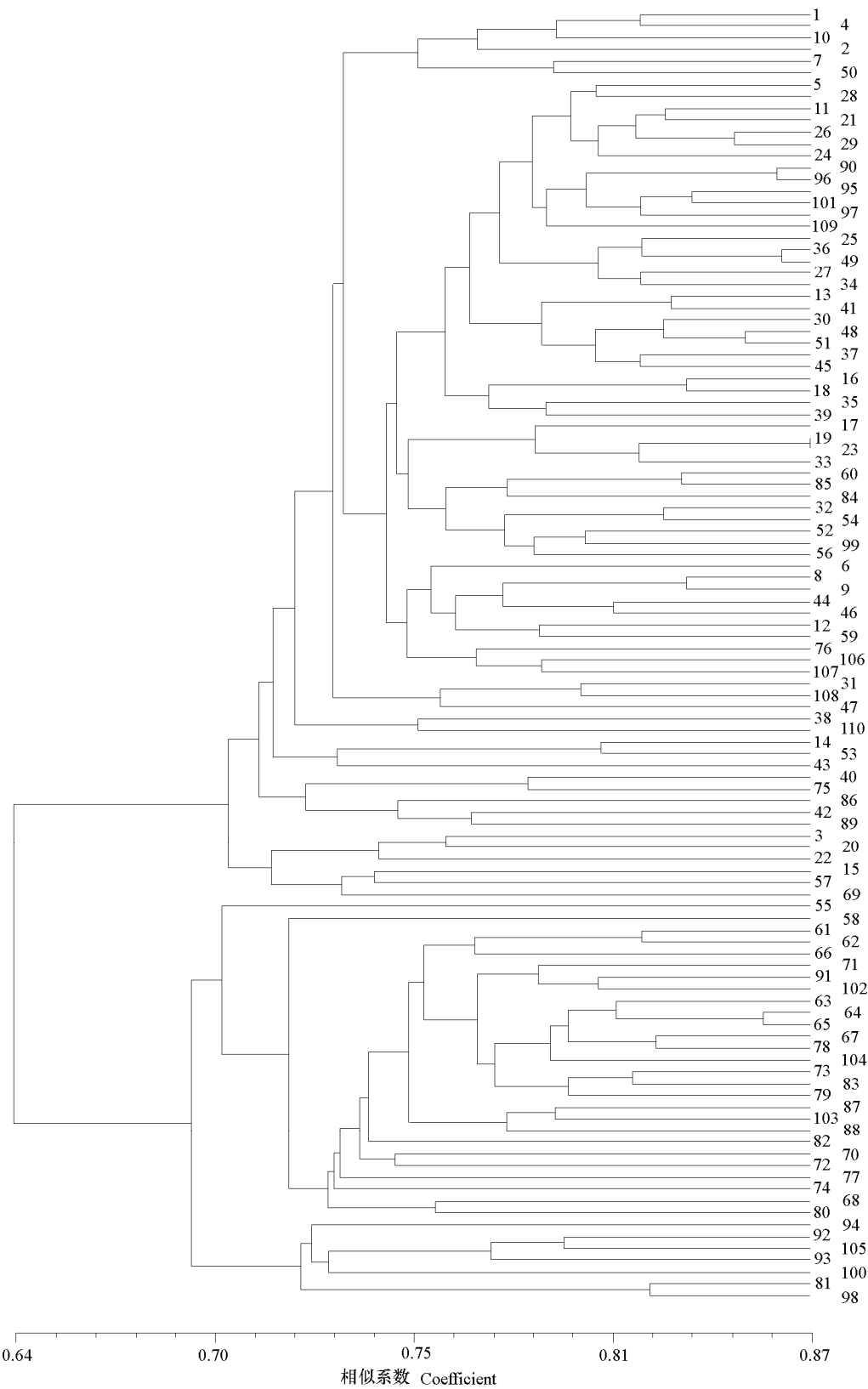


图 1 菠菜种质 AFLP 分析遗传相似性聚类图（代码见表 1）

Fig. 1 Genetic similarity cluster based on AFLP analysis in *Spinacia oleracea* L. cultivars (Code see table 1)

此外,利用 NTSYSpc2.10 软件对 110 份菠菜种质材料进行主坐标分析。各种质材料的位置分布可以直观地反映出其种源的遗传变异及亲缘关系,位置相靠近的种质材料间关系更密切,反之则表明关系疏远。主坐标分析的聚类可将所有的种质材料分为 2 组:第 1 组包含欧美种质材料、与欧洲地理相近的亚洲种质材料和大部分中国北方种质材料,其中欧美种质材料分布较为集中。第 2 组包含了部分东亚种质材料、中国南方种质材料和少部分的中国北方种质材料,本组中中国南方种质材料分布较为集中。并且在两组间交界处以西亚种质为主,此分析结果正好与菠菜来源中心相对应。主坐标分析结果与 UPGMA 聚类结果基本一致。

用 popgene1.32 软件计算各组群间的 Nei's 遗传距离和遗传一致度(表 4),其中中国北方组群(NC)与东亚组群(EA)的遗传距离最小为 0.0324,遗传一致度最高为 0.9681,表明彼此间的亲缘关系在供试组群间最近,组群间遗传分化较小;中国南方组群(SC)与东欧组群(EE)的遗传距离最大为 0.2080,遗传一致度最低为 0.8122,表明彼此间的亲缘在供试组群间最远,组群间遗传分化较大。

表 4 组群间的 Nei's 遗传距离和遗传一致度

Table 4 Nei's genetic distance and genetic identity among spinach groups

组群 Groups	SC	NC	EA	WA	EE	ME	WE	SE	A
SC	****	0.9384	0.9308	0.8747	0.8122	0.8700	0.8697	0.8643	0.8648
NC	0.0636	****	0.9681	0.9253	0.8791	0.9401	0.9410	0.9272	0.9213
EA	0.0717	0.0324	****	0.9327	0.8920	0.9477	0.9469	0.9398	0.9267
WA	0.1339	0.0777	0.0697	****	0.8931	0.9602	0.9481	0.9485	0.9229
EE	0.2080	0.1289	0.1143	0.1130	****	0.9328	0.9027	0.9223	0.9005
ME	0.1392	0.0617	0.0538	0.0406	0.0695	****	0.9677	0.9641	0.9369
WE	0.1396	0.0609	0.0546	0.0533	0.1024	0.0328	****	0.9543	0.9293
SE	0.1459	0.0756	0.0621	0.0529	0.0809	0.0366	0.0468	****	0.9341
A	0.1452	0.0820	0.0761	0.0802	0.1048	0.0652	0.0733	0.0681	****

注:左下角为 Nei's 遗传距离,右上角为遗传一致性。

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) .

基于 Nei's 遗传距离的聚类分析发现,所有组群可明显分为 2 大类(图 2)。在 Nei's 遗传距离为 0.88 处,中国南方组群(SC)与其他组群分开,单独聚为一类,其余的供试组群聚为第二类。在 Nei's 遗传距离为 0.93 处,第二类中的各组群聚为 3 个亚类,东欧组群(EE)、美国组群(A)分别单独聚为一个亚类,其余组群聚为一个亚类。该亚类中,中国北方组群(NC)和东亚组群(EA)

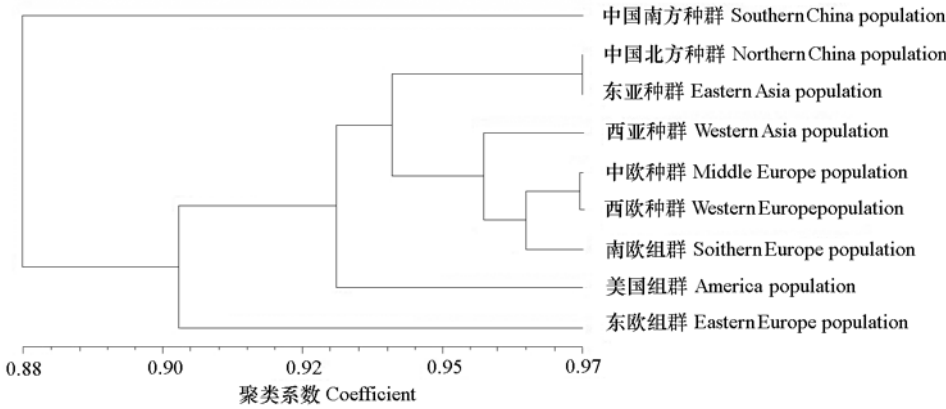


图 2 基于 Nei's 遗传距离的菠菜种质组群聚类图

Fig. 2 Dendrogram among groups of *Spinacia oleracea* L. germplasm based on Nei's genetic distance

亲缘关系较近, 聚为一组; 西亚组群 (WA)、中欧组群 (ME)、西欧组群 (WE) 和南欧组群 (SE) 亲缘关系较近, 聚为一组。

基于 Nei's 遗传距离组群间的聚类分析表明, 中国南方组群与其他供试组群间的亲缘关系较远, 欧洲各组群间有较近的亲缘关系, 与地理相接的西亚组群亲缘关系密切, 种质交流频繁, 且与美国组群、东亚组群及中国北方组群的亲缘关系较近。

3 讨论

3.1 菠菜种质的遗传多样性

菠菜在世界各地广泛种植, 不同地域不同纬度复杂多变的气候和人工选择, 使得菠菜在长时期的选择下形成了较为丰富的遗传多样性。Brian 和 Irish (2004) 利用 AFLP 技术对来自美国农业部收集的 49 份地理来源不同的菠菜种质进行遗传多样性分析, 结果显示 AFLP 是评价菠菜种质间亲缘关系的有效工具, 供试材料间的遗传相似系数在 0.58 ~ 0.95 之间, 与其他作物相比菠菜种质具有较高的遗传多样性; 张南 (2007) 利用形态学标记和 RAPD 标记对 24 份菠菜种质进行遗传多样性研究, 结果获得 55.3% 的多态位点百分率, 遗传相似系数变幅为 0.66 ~ 1.00, 形态学标记与 RAPD 标记研究结果基本一致; Hu 等 (2007) 利用 TRAP 标记技术, 对部分菠菜种质进行了遗传多样性的研究, 获得 19.5% 的多态百分率, 供试种质间遗传相似系数介于 0.42 ~ 0.90 之间; 本研究中, 110 份菠菜供试种质材料的遗传多样性水平为 23.6%, 遗传相似系数介于 0.64 ~ 0.87 之间, 该结果与 Brian、Hu 的研究结果相当, 表明本研究收集到的菠菜种质遗传多样性丰富, 对于菠菜杂交育种研究是非常有价值的资源, 并进一步说明 AFLP 可作为菠菜亲缘关系和品种鉴定的有效工具。但本研究中得出 23.6% 的多态位点百分率与张南 55.3% 的多态位点百分率的研究结果差异较大, 可能由于二者使用的方法不同。RAPD 标记覆盖整个基因组, 揭示了编码或非编码的区段, 重复的或单拷贝的区段 (John et al., 1990), 而 AFLP 分析, 对引物的额外选择以及扩增以限制性酶切片段为基础随机进行, 所以对于那些较长的重复片段可能会低估其变异, 这与 RAPD 和 AFLP 标记在甜 (辣) 椒 (李丽 等, 2004) 和朝天椒 (贺洁, 2007) 等中的研究结果一致。

此外, 本研究对供试菠菜种质的 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数的分析表明, 菠菜种质具有相对较高的遗传多样性, 这可能与异花传粉的生物学特性有关, 另外, 还与本研究中供试种质的来源地广泛, 不同地区保存的其特有等位基因有关。在各组群的遗传多样性分析中, 中国的南方组群和北方组群的 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信息指数都具有较高的值, 国外组群相对较低。这可能与地域辽阔, 菠菜种植范围广泛, 不同地区存在不同的气候格局相关, 还与在长期的自然选择与人工选择中积累了丰富的遗传变异有关。

3.2 菠菜种质的亲缘关系

本研究中, 基于种质间遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析, 将 110 份供试种质材料分为两大类, 其中大部分供试种质材料能够按照地理来源聚类。第 1 大类主要是欧美种质、西亚种质、中国北方种质和部分东亚种质。第 2 大类以中国南方种质和部分日本种质为主。由于这两大类遗传相似性系数仅为 0.65, 所以推测他们有着不同的起源。大部分来自欧洲不同国家的种质交叉分布在各组, 主要由于欧洲各国在地理位置上相互交错, 且物质、文化交流频繁, 组群间相互迁移, 具有广泛的基因交流; 俄罗斯地处亚欧大陆与韩国在地理位置上相近, 因此来自俄罗斯和韩国的种质间交流频繁, 亲缘关系较近; 美国种质与欧洲种质间有较近的亲缘关系, 且自成一组, 这也进一步证实了菠菜是

通过早期殖民地的产生随即传入美国的 (Pandey & Kalloo, 1993)。来自土耳其和伊拉克的西亚种质, 与欧美种质聚在一起, 这两个国家地处南欧与西亚交界处, 与菠菜起源地古波斯一带相近, 推测可能是欧美种质祖先种的近缘种。该 UPGMA 聚类分析中, 也有部分来自日本的种质材料没有按照地理来源聚类, 在第 1 大类和第 2 大类中均有分布, 主要是由于日本菠菜育种居于世界领先水平, 所以一些日本的供试种质材料很可能是日本材料和其他地区材料经过改良后的产物, 所以这部分材料根据遗传背景的不同分别聚类到不同的类群是合乎情理的。主坐标分析结果与 UPGMA 聚类结果基本一致。

基于 Nei's 遗传距离的聚类分析可将 9 个组群分为两大类。组群间的聚类与种质间的 UPGMA 聚类、主坐标分析结果基本一致。由种质间的亲缘关系推测, 菠菜由起源中心向不同的方向扩散、传播, 欧洲、西亚和中国北方种质, 与中国南方种质来源于不同的扩散支序。菠菜原产古波斯, 现伊朗一带, 向西北方向的传播产生了欧洲、西亚及中国北方种质这个扩散分支, 向东北方向的传播产生了中国南方种质这个扩散分支, 由于收集到的种质资源有限, 菠菜种质具体的传播途径还需进一步证明。总之, 种质间亲缘关系的分析, 在实际操作中可以指导亲本选配, 选择亲缘关系较远的材料, 增加后代的遗传和变异, 为菠菜育种提供直接的理论指导和借鉴意义。

菠菜原产于古波斯, 于 11 世纪传入西班牙, 13 世纪在德国普遍种植, 此后普及欧洲各国 (Pandey & Kalloo, 1993)。后期, 通过早期殖民地的产生传入美国, 1806 年在美国开始普遍种植并计入美国种子目录 (Ryder, 1979)。相传在唐朝贞观 2 年, 尼泊尔将菠菜籽作为贡品相赠, 传入中国。在中国, 菠菜距今已有 1 300 多年的栽培历史。从本研究可得出, 中国的菠菜种质以长江流域为界, 南、北方种质分别聚在两大类中, 亲缘关系较远。北方种质与欧美种质亲缘关系较近, 而南方种质与部分东亚种质亲缘关系较近, 且南、北方种质在遗传相似系数为 0.65 处分别聚到两大类中, 说明两者有着不同的起源。且中国南、北方组群的遗传多样性都很高, 说明菠菜在中国南、北方的种植历史都很悠久。结合史料记载推测, 中国南、北方菠菜种质资源来源于不同的原始种。一部分种质由古波斯一带, 流经南亚, 传入中国的南方地区, 另一部分种质与欧洲种质亲缘关系密切, 且与西亚种质聚为一类, 该部分种质则是由起源中心传入欧洲, 再传播到中国北方地区, 这可能也是导致中国菠菜种质资源遗传多样性相对丰富的重要原因之一。

References

- Brian M Irish. 2004. New races of the downy mildew pathogen of spinach, identification of molecular markers for disease resistance, and molecular diversity of spinach germplasm. Fayetteville: University of Arkansas.
- Doyle J J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation // Hewitt G M, Johnston A. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer-Verlag: 283 - 293.
- He Jie. 2007. Application and comparison of RAPD and AFLP markers in genetic diversity of pepper [M. D. Dissertation]. Kaifeng: Henan University. (in Chinese)
- 贺 洁. 2007. RAPD 标记和 AFLP 标记在朝天椒遗传多样性上的应用及比较 [硕士论文]. 开封: 河南大学.
- Hu Jinguo, Mou Bei quan, Brady A. Vick. 2007. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. Genet Resour Crop Evol.
- Jiang Ming, Zhao Yue, Xie Jian-ming, Tian Ren-peng, Chen Yan-yang, Kang Jun-gen. 2011. Development of a SCAR marker for *Fusarium* wilt resistance in cabbage. Scientia Agricultura Sinica, 44 (14): 3053 - 3059. (in Chinese)
- 姜 明, 赵 越, 颀建明, 田仁鹏, 陈延阳, 康俊根. 2011. 甘蓝抗枯萎病 SCAR 标记的开发. 中国农业科学, 44 (14): 3053 - 3059.
- John G K Williams, Anne R Kubelik, Kenneth J Livak, J Antoni Rafalsk, Scott V Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531 - 6535.
- Kalloo G, Bergh B O. 1993. Genetic improvement of vegetable crops. New York: Pergamon Press: 325 - 338.

- Li Li, Zheng Xiao-ying, Klocke E. 2004. Variation in some *Lycopersicon esculentum* and *Capsicum annuum* cultivars revealed by RAPD and AFLP markers. *Guangxi Sciences*, 11 (3): 249 - 257. (in Chinese)
- 李 丽, 郑晓鹰, E Klocke. 2004. 应用 RAPD 和 AFLP 标记的方法对甜(辣)椒和番茄品种的多态性分析. *广西科学(英文版)*, 11 (3): 249 - 257.
- Luige R, Concetta L. 2007. Further isolation of AFLP and LMS markers for the mapping of the Ol-2 Locus related to powdery mildew (*Oidium neolycoopersici*) resistance in tomato. *Plant Science*, 172: 746 - 755.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 70: 3321 - 3323.
- Ryder E J. 1979. *Leafy salad vegetables*. Westport CT: Avi Publishing Company.
- Shen Chun-mei, Zhang Sheng-guo, Wang Cheng-ye. 2008. The cultivation technology of summer spinach. *Science and technology of Sichuan Agriculture*, (4): 31. (in Chinese)
- 沈春梅, 张盛国, 王成业. 2008. 夏菠菜栽培技术. *四川农业科技 - 种植技术*, (4): 31.
- Song Shun-hua, Zheng Xiao-ying. 2006. Analysis of AFLP fingerprinting in cabbage cultivars testing. *Molecular Plant Breeding*, 4 (3): 51 - 54. (in Chinese)
- 宋顺华, 郑晓鹰. 2006. 甘蓝品种的 AFLP 指纹鉴别图谱分析. *分子植物育种*, 4 (3): 51 - 54.
- Su Yong-tao, Liu Yang, Zhuang Tian-ming, Chen Huo-ying. 2010. Tomato cultivar fingerprint analysis with AFLP. *China Vegetables*, (18): 34 - 39. (in Chinese)
- 苏永涛, 刘 扬, 庄天明, 陈火英. 2010. 栽培番茄品种指纹图谱的 AFLP 分析. *中国蔬菜*, (18): 34 - 39.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Zabeau M, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407 - 4414.
- Yang Fu-qiang, Li Lin, Li Ming-yuan, Liu Li-ying, Ren Hua-zhong. 2009. Genetic diversity and phylogenetic relationship of Chinese warty cucumber germplasm based on AFLPs. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 18 (6): 205 - 211. (in Chinese)
- 杨福强, 李 琳, 李明远, 刘丽英, 任华中. 2009. 中国刺瘤型黄瓜种质遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析. *西北农业学报*, 18 (6): 205 - 211.
- Yuan He, Zhang Cheng-he, Liu Hai-he, Xuan Shu-xin, Li Xiao-feng, Shen Shu-xing. 2009. Chromosomal location and AFLP marker screening of genic male sterile gene in Chinese cabbage. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (6): 2061 - 2067. (in Chinese)
- 袁 鹤, 张成合, 刘海河, 轩淑欣, 李晓峰, 申书兴. 2009. 大白菜雄性核不育基因的染色体定位及 AFLP 分子标记筛选. *中国农业科学*, 42 (6): 2061 - 2067.
- Yuan Yu-wei. 2008. Study on residues dynamics and maximum residue limits of pesticides applied in spinach production [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 袁玉伟. 2008. 菠菜中常用农药残留动态及其限量研究[博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Zhang Nan. 2007. Study on the genetic diversity and the low temperature tolerance of spinach germplasm [M. D. Dissertation]. Haerbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 张 南. 2007. 菠菜种质资源遗传多样性及耐寒性鉴定[硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Zhang Tian-ming, Qu Dong-yu, Wang Chang-lin, Wang Ying-jie, Liu Yi-sheng. 2006. Relationships analysis of cucurbita by AFLP. *China Vegetables*, (1): 11 - 14. (in Chinese)
- 张天明, 屈冬玉, 王长林, 王迎杰, 刘宜生. 2006. 南瓜属蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析. *中国蔬菜*, (1): 11 - 14.
- Zheng Xian-yun, Guo Ya-ping, Ma En-bo. 2003. Development of amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. *Chemistry of Life*, 23 (1): 65 - 67. (in Chinese)
- 郑先云, 郭亚平, 马恩波. 2003. AFLP 分子标记技术的发展. *生命的化学*, 23 (1): 65 - 67.