

钟丽凡,吕长平,许文婷,等. 湖南本土牡丹遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):34-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.009

湖南本土牡丹遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析

钟丽凡, 吕长平, 许文婷, 陈海霞

(湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128)

摘要:用简单重复序列区间(Inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)分子标记技术分析湖南本土牡丹资源遗传多样性和亲缘关系。结果表明,用筛选出的 11 条引物对 18 个牡丹品种进行扩增,共获得 164 条谱带,其中多态性条带 133 条,多态性比例达 81.1%。通过 PopGen32 软件分析出 18 个牡丹品种的有效等位基因(N_e)介于 1.05~1.90 之间,平均值为 1.34;Shannon's 信息指数(I)介于 0.12~0.60 之间,平均值为 0.34;Nei's (1973) 基因多样性指数(H)介于 0.05~0.40 之间,平均值为 0.22。利用 NTSYSpc 2.1 软件构建全部材料非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,简称 UPGMA)树状图可得:在相似系数为 0.74 处可将供试材料划分为 4 个类群,显示出湖南本土牡丹品种具有丰富的遗传多样性,从分子水平上揭示了湖南本土牡丹的亲缘关系,为选育优良性状的新品种提供理论依据。

关键词:湖南;牡丹;ISSR;遗传多样性;亲缘关系

中图分类号: S685.110.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0034-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)为芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paeonia* L.)牡丹组(Sect. Moutan DC.)植物,是我国特有的植物种质资源^[1-3]。我国牡丹品种多样,观赏牡丹分布地区以西北地区为主。湖南也是牡丹自然分布地区之一,其品种耐高温高湿、抗病虫害,但花色单一、花型简单缺乏观赏价值。因此,如何将观赏牡丹与湖南牡丹的优良特性结合成为当前推广湖南牡丹的首要任务。

目前牡丹育种工作主要以人工定向杂交选择为主^[4-5]。但现有湖南牡丹品种大多数亲缘不清,对湖南具体牡丹品种数的统计比较笼统,存在育种工作效率低下、品种出新率低的问题。因此,研究清楚湖南本土牡丹种质资源亲缘关系与遗传多样性对后续的选育工作至关重要。

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)分子标记,由简单重复序列(SSR)标记技术发展而来,ISSR 分子标记结合了随机扩增多态性 DNA(randomly amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)的优点,同时克服了

RAPD、SSR、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,简称 RFLP)等技术的缺点^[6-7],具有高效、快速、稳定、易操作、成本低等优点,目前广泛应用于亲缘关系鉴定、种质资源遗传多样性分析等领域。本试验采用 ISSR 分子标记技术对湖南本土牡丹亲缘关系和遗传多样性进行研究,为选育优良牡丹品种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

通过走访湖南当地林业和农业部门、公司、企业、个体从业爱好者,对栽培时间长、来源不清的湖南牡丹种质资源进行调查。2014—2016 年于开花期(3 月下旬至 4 月上旬)、种子成熟期(7 月下旬)、引种期(10 月中下旬)在湖南牡丹的主要产地(邵阳、湘西、长沙)对资源识别、挂牌标记、形态特征、观赏特性及生长情况进行调查,共收集了 18 份性状稳定、植株平均年龄 10 年以上的湖南本土牡丹品种(表 1)。采集牡丹新鲜嫩叶保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 DNA 提取与检测

采用笔者所在实验室改良的十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)法进行提取,提取的样品用紫外分光光度计检测质量浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳粗略检测样品 DNA 的浓度与纯度,最后稀释标定为 50 ng/μL,保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.3 ISSR-PCR 优化反应体系和引物筛选

1.3.1 ISSR-PCR 基本反应体系 通过多次重复验证试验,

related leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase genes in *Lycium ruthenicum* Murr [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2014,23(6):369-377.

[10] Litz R E. The mango: botany, production and uses[M]. UK: CABI Head Office, 2005.

[11] Wang Y P, Yang Z M, Zhang B. Identification of protein related to

biosynthesis of condensed tannin in *Onobrychis tanaitica* Spreng[J]. Acta Agrestia Sinica, 2000, 8(2): 126-131.

[12] Bogs J, Downey M O, Harvey J S, et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves[J]. Plant Physiology, 2005, 139(2): 652-663.

表1 18份牡丹品种及来源

编号	品种	产地	花色	花型
1	凤丹白	湖南邵阳	白色	单瓣型
2	凤丹星	湖南邵阳	白色	单瓣型
3	凤丹	湖南邵阳	白色	单瓣型
4	凤丹紫	湖南邵阳	紫色	单瓣型
5	凤丹粉	湖南邵阳	粉色	荷花型
6	凤丹菱	湖南邵阳	白色	单瓣型
7	凤丹舞	湖南邵阳	白色	单瓣型
8	凤丹绿	湖南邵阳	绿色	单瓣型
9	凤丹玉	湖南邵阳	白色	单瓣型
10	宁乡红	湖南宁乡	红色	菊花型
11	酃家香	湖南邵阳	紫色	单瓣型
12	宝庆红	湖南邵阳	红色	单瓣型
13	宝庆粉	湖南邵阳	粉色	单瓣型
14	紫绣球	湖南长沙	紫色	球花台阁型
15	湘绣球	湖南永顺	粉色	球花台阁型
16	永顺粉	湖南永顺	粉色	荷花型
17	湘紫斑	湖南邵阳	粉色	单斑型
18	杨山牡丹	湖南永顺	粉色	单瓣型

筛选出 2 × TransTaq High Fidelity PCR SuperMix I (内含适量的 Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶) 作为总的反应环境。25 μL PCR 反应体系: 2 × TransTaq High Fidelity PCR Super Mix I 12.5 μL、引物 (10 μmol/L) 1 μmol/L、模板 (50 ng/μL) 50 ng, 最后加入 ddH₂O 补足 25 μL。

1.3.2 ISSR-PCR 优化反应体系 按照 L₉ (3³) 正交试验设计的方法^[8-10], 进行体系总体积、模板浓度、琼脂糖浓度的正交组合, 每个处理重复 3 次 (表 2), 最终建立的最佳反应体系: 20 μL 反应总体积, 模板浓度 30 ng/μL, 琼脂糖浓度 1.5%。然后在 BIO-RAD PowerPac HV 下以 110 V 的恒定电压电泳 30 min, 最后用凝胶成像系统 (BIO-RAD Gel Doc™ XR+) 拍照分析。

扩增反应在 Applied Biosystems 9902 PCR 仪上进行, PCR

表2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验

处理组合	因素		
	体系总体积(μL)	模板浓度 (ng/μL)	琼脂糖浓度 (%)
1	10	20	1.0
2	20	30	1.5
3	25	50	2.0
4	10	30	1.5
5	20	20	1.0
6	25	50	2.0
7	10	50	2.0
8	20	20	1.0
9	25	30	1.5

反应程序: 95 °C 4 min; 94 °C 45 s, 50 ~ 60 °C 45 s, 72 °C 1.50 min, 共计 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存^[11]。

1.3.3 引物筛选 选用哥伦比亚大学 (UBC) 开发的 ISSR 100 个通用引物^[12-13], 利用优化的反应体系进行引物筛选, 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成; 引物退火温度参照相关研究^[4, 11-12]。最后从 100 条引物中筛选出 11 条条带清晰、重复性好的引物。

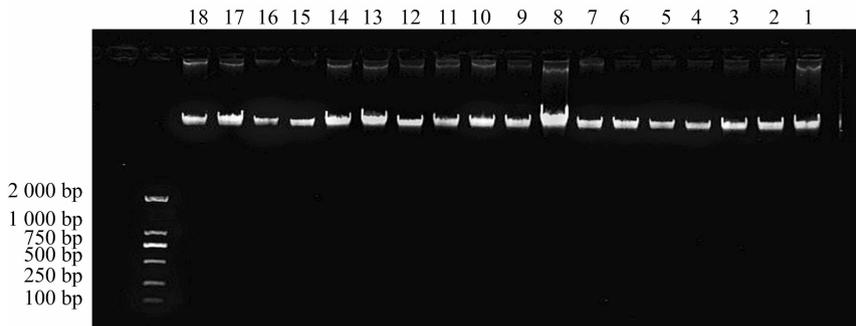
1.4 图谱分析

图谱以 0、1 数据统计, 在同一引物、同一位点根据条带的有 (1)、无 (0) 形成原始数据矩阵 (0、1) 矩阵^[14-17]。利用 PopGen32 软件计算多态位点比例 (PPB)、Shannon's 信息指数、Nei's 基因多样性指数等。用 NTSYS2.10 软件计算遗传相似系数和构建品种亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 牡丹 DNA 提取结果

牡丹基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 每个点样孔包括 5 μL 样品 DNA 和 1 μL 上样缓冲液, 各个条带大小基本一致, 基本无拖尾现象 (图 1)。



1~18 对应品种与表 1 中一致, 图 2、图 3 同

图1 18份牡丹品种 DNA 电泳

2.2 ISSR-PCR 体系筛选结果

反应体系 (20 μL) 如下: 2 × TransTaq High Fidelity PCR SuperMix I 10 μL、DNA 模板 (30 ng/μL) 1 μL、引物 1 μL、ddH₂O 8 μL。用 1.5% 琼脂糖凝胶对扩增结果进行电泳。由图 2 可以看出, 条带数量多且清晰可见, 易于区分。

2.3 引物扩增结果

11 条引物共扩增出 162 条条带, 多态性条带 133 条, 平均多态性比例 82.6%。其中, 引物 UBC811 扩增的条带数最多, 为 22 条, 多态性比例 86.4% (图 3、表 3)。

2.4 18 份牡丹品种遗传多样性分析

本试验通过软件 PopGen32 分析出供试牡丹品种的有效等位基因数 (N_e) 介于 1.05 ~ 1.90 之间, 平均值为 1.34^[12-17]; Shannon's 信息指数 (I) 介于 0.12 ~ 0.60 之间, 平均值为 0.34; Nei's (1973) 基因多样性指数 (H) 介于 0.05 ~ 0.40 之间, 平均值为 0.22。

2.5 18 份牡丹品种非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, 简称 UPGMA) 聚类分析

用 NTSYSpc 2.1 软件构建全部材料 UPGMA 树状图 (图

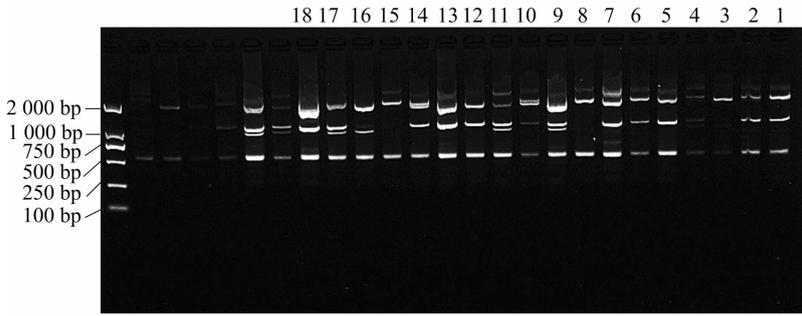


图2 引物 UBC866 对 18 个牡丹品种的扩增

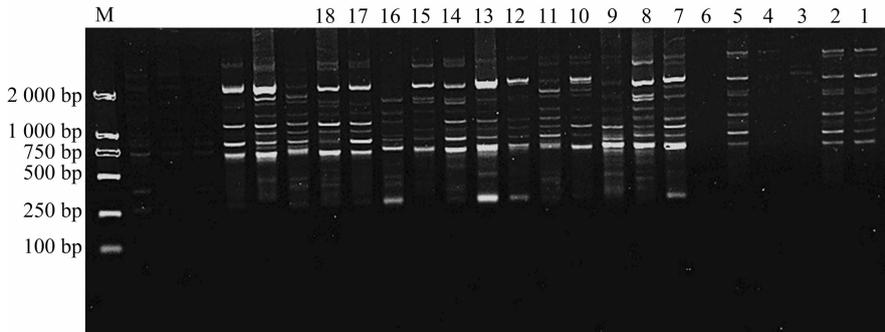


图3 引物 UBC811 对18份牡丹品种的扩增结果

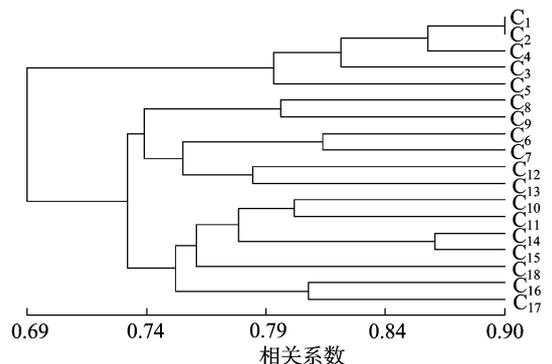
表 3 ISSR 引物及其扩增产物的多态性水平

引物名称	序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	扩增条带总数 (条)	多态性条带数 (条)	多态性比例 (%)
UBC 811		58	22	19	86.4
UBC 864		55	17	15	88.2
UBC 815	(GA) ₈ C	54	16	15	93.8
UBC 841	(ATG) ₆	56	15	15	100.0
UBC 824	(CT) ₈ G	54	14	12	85.7
UBC 853	(GA) ₈ YC	51	14	12	85.7
UBC 835	(TC) ₈ CG	59	17	8	47.1
UBC 827	(CT) ₈ RT	60	16	11	68.8
UBC 825	(AG) ₈ YC	55	11	9	81.8
UBC 859	(AC) ₈ G	53	11	9	81.8
UBC 866	(AC) ₈ T	59	9	8	88.9
合计	(TG) ₈ RC		162	133	
平均	(CTC) ₆		14.7	12	82.6

4),以相似系数 0.733 为阈值可将 18 份牡丹品种分为三大类。凤丹白、凤丹星、凤丹紫、凤丹、凤丹粉被划为第一大类,共 5 个品种,其中凤丹白与凤丹星的相似系数最近,说明它们的亲缘关系最近。第二大类包括凤丹绿、凤丹玉、凤丹绫、凤丹舞、宝庆红、宝庆粉共 6 个品种。第三大类包括杨山牡丹、永顺粉、宁乡红、邳家香、紫绣球、湘绣球、湘紫斑。当相似系数值为 0.74 时,把 18 份牡丹品种分为 4 个类群,其中 C₈ 和 C₉ 单独分为一类,由此说明凤丹绿与凤丹玉 2 个品种的遗传背景与其他品种差异比较大。

3 讨论

本研究通过反复试验挑选出混合了 Mg²⁺、dNTPs、Taq



C₁~C₁₈ 分别对应表 1 中编号为 1~18 的品种
图4 UPGMA 法构建的 18 份牡丹品种聚类结果

DNA聚合酶在内的反应体系,然后从总反应体积、DNA模板浓度、琼脂糖浓度3个方面进行结果筛选对比,最后挑选出了适合大部分引物扩增的最适反应体系,而且结果稳定,有效地节省了试验时间,提高了试验的精确度。

本试验用筛选出的11条引物对18份湖南本土牡丹资源进行扩增,共扩增出164条条带,多态性比例为81.1%,由此说明湖南本土牡丹资源丰富,品种间存在较丰富的遗传变异,具有比较复杂的遗传背景。

本研究中以NTSYS 2.1作为分析软件,利用UPGMA法在阈值为0.74时将供试牡丹品种分为4个类群^[18-20],分析结果可以看出,基本品种都显示出花色和花瓣复杂程度的优势优先聚合在一起。第一类牡丹品种花色基本都是白色,只有凤丹粉为粉色,凤丹紫为紫色,初步分析这2个品种可能是凤丹白与非白色系牡丹品种的杂交后代表现出的亲本性状。第二类2个品种花型偏小,植株比较低矮,所以从聚状图上可看出这2个品种单独聚为一类,说明形态学鉴定与分子标记技术具有一定的关联性,表明这2个品种的遗传性状相比其他品种差异比较大。第三类中凤丹绫与凤丹舞都为白色花,凤丹绫的花瓣顶部羽状浅裂,凤丹舞的花瓣顶部锯齿状浅裂,花型都为单瓣型,相似系数比较大,说明亲缘关系比较近。宝庆红与宝庆粉2个品种在形态学性状上基本相似,且在分子标记学上表明它们的亲缘关系很近。第四类几乎所有的品种花色都比较艳丽,宁乡红与酃家香的相似系数最接近,说明它们的遗传背景相似;紫绣球与湘绣球花型都为球花台阁型,花色比较接近,根据聚状图的分析,它们的亲缘关系比较接近,而湘紫斑的相似系数最小,说明它们的亲缘关系最远。从来源地分析,表明同一地域品种相似度比较高,而且基本是2个形状非常相似的品种聚合在一起,推测是由于近距离的异花授粉而出现的性状分离的杂交后代。

目前,牡丹新品种选育基本依赖于传统的人工杂交方法,耗时长,基本每3年才能进行选育;选择亲本的过程比较盲目,而湖南有丰富的牡丹种质资源,牡丹品种具有耐高温、高湿、抗病虫害的优良性状,充分了解湖南本土牡丹品种的遗传多样性与亲缘关系将有助于提高选育的效率与质量,从而为观赏牡丹与湖南本土油用牡丹的杂交提供便利,为牡丹在南方市场的推广打下基础。

参考文献:

[1]洪德元,潘开玉.牡丹芍药分会:推动牡丹深加工[J].中国花卉园艺,2015(5):27.
[2]洪涛,张家勋,李嘉珏,等.中国野生牡丹研究(一)芍药属牡丹

组新分类群[J].植物研究,1992,12(3):223-234.
[3]杨淑达,施苏华,龚洵,等.滇牡丹遗传多样性的ISSR分析[J].生物多样性,2005,13(2):105-111.
[4]石颜通,周波,张秀新,等.牡丹89个不同种源品种遗传多样性和亲缘关系分析[J].园艺学报,2012,39(12):2499-2506.
[5]周波,江海东,张秀新,等.部分引进牡丹品种的形态多样性[J].生物多样性,2011,19(5):543-550.
[6]陈涛林,王汉超,罗军武,等.汝城白毛茶种质资源遗传多样性和亲缘关系的ISSR分析[J].分子植物育种,2017,15(9):3780-3787.
[7]刘彤,葛智文,陈涛林,等.柳州九万山野生茶树种质资源遗传多样性的ISSR分析[J].南方农业学报,2015,46(11):1943-1948.
[8]麻扬,白学良,赵东平.山羽藓ISSR-PCR反应体系优化及引物筛选[J/OL].分子植物育种,2017-09-27[2017-11-10].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20170927.1711.016.html>.
[9]任秀霞,张盈,薛璟祺,等.滇牡丹天然居群的遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(4):772-780.
[10]赵孟良,孙雪梅,王丽慧,等.43份菊芋种质资源遗传多样性的ISSR分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(9):150-156,177.
[11]张昱恒,金晓玲,成仿云,等.湖南产牡丹遗传多样性的ISSR分析[J].中草药,2016,47(7):1193-1198.
[12]杨美玲,唐红.紫斑牡丹遗传多样性的ISSR分析[J].西北植物学报,2012,32(4):693-697.
[13]高昊丹.芍药属植物的综合评价及其亲缘关系的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2012.
[14]童芬,谢登峰,曾心美,等.四川牡丹和圆裂四川牡丹遗传多样性的ISSR分析[J].西北植物学报,2016,36(10):1968-1976.
[15]杨美玲.紫斑牡丹遗传多样性的ISSR分析[D].兰州:甘肃农业大学,2012.
[16]蔡健,李浩,赵翔,等.22个牡丹品种形态性状的多样性分析[J].安徽农业科学,2015,43(35):57-59.
[17]孙嘉磊,杨志刚,罗兵,等.21个日本牡丹品种DNA指纹图谱构建与EST-SSR标记遗传多样性分析[J].江苏农业科学,2015,43(9):50-53.
[18]宋倩倩,付茂旺,何艺凡,等.福建省浙江红花油茶遗传多样性的ISSR分析[J].四川农业大学学报,2017,35(3):370-374.
[19]李昂,葛頌.植物保护遗传学研究进展[J].生物多样性,2002,10(1):61-71.
[20]武玉珍,冯睿芝,张峰.基于ISSR分子标记的褐马鸡亲缘关系分析[J].生态学报,2015,35(4):1059-1067.