

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.013

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

孙嘉磊,杨志刚,罗 兵,孙海燕
(常熟理工学院生物工程系,江苏常熟 215500)

摘要:采用 EST-SSR 标记构建中国常熟尚湖牡丹园引栽的 21 个日本牡丹品种 DNA 指纹图谱并进行遗传多样性分析。以筛选出的 10 对多态性高、稳定性好且在染色体上分布均匀的引物作为核心引物,构建日本牡丹 21 个品种 DNA 指纹图谱,用 NTSYS-PCV2.10 软件分析遗传多样性。结果表明,10 对 EST-SSR 引物在 21 份材料中共扩增出 47 个多态性基因型,平均每对引物扩增 4.7 个,变幅 1~11 个;10 对引物的多态性频率(*FP*)平均值为 0.522,变幅 0.227~0.950;筛选出的 2 对核心引物可以将 21 个牡丹品种完全区分,以遗传相似系数 0.55 为阈值可将 21 个供试牡丹品种分成 2 类。由结果可知,EST-SSR 标记在供试牡丹品种间多态性差异较大,适合用于牡丹的 DNA 指纹图谱的构建。

关键词:EST-SSR;DNA 指纹图谱;遗传多样性;牡丹品种
中图分类号:S685.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0050-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andrews.)花大色艳,花香袭人,有“国色天香”之美誉,深受人们喜爱。关于 DNA 指纹技术在牡丹品种鉴别上的应用,前人做了很多研究。朱红霞利用 AFLP 标记对牡丹品种的分类进行了初步探索^[1]。Hosoki 等利用 RAPD 标记技术对牡丹品种和野生牡丹品种的 DNA 序列进行了尝试性分析^[2]。由于技术比较成熟,以微卫星序列为基础的 SSR 标记成为当前植物品种 DNA 指纹图谱数据库的首选标记^[3]。李保印利用 SSR 标记技术研究中原牡丹品种初级核心种质和遗传多样性,并建立了核心种质^[4]。王森等研究讨论了牡丹品种的 SSR-PCR 反应条件^[5]。SSR 分子标记技术可以用来区分牡丹品种,这是不容争辩的事实^[6],近年来 EST (expressed sequence tages)发展十分迅速,而 EST-SSR 与其他鉴别途径相比,是一种相对准确、简便、经济的途径^[7]。Temnykh 等研究显示,他们所发现的牡丹 EST-SSR 位点绝大多数都具有多态性潜能^[8]。张艳丽等以 6 个滇牡丹不同花色类群 DNA 为模板,对 EST-SSR 引物进行了筛选^[9]。

牡丹品种的起源地在中国,在中国牡丹园艺栽培不断发展的同时,日本也早就开始进行牡丹园艺品种的杂交培育和引种工作,形成了具有地方特色的牡丹品种群^[10],而目前针

对国内引栽的日本品系牡丹开展 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性的研究还未见报道。本研究采用 EST-SSR 标记构建中国常熟尚湖牡丹园 21 份日本品系牡丹品种的 DNA 指纹图谱并进行遗传多样性分析,以期对牡丹品种 DNA 指纹鉴定提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

21 份牡丹品种为中国常熟尚湖牡丹园引栽的日本牡丹品种,详见表 1。

表 1 供试 21 份日本牡丹主栽品种概况

编号	品种名称	花色	编号	品种名称	花色
1	岛锦	复色	12	岛大臣	紫
2	岛辉	红	13	金晃	黄
3	日暮	红	14	海黄	黄
4	百花选	红	15	玉廉	白
5	火鸟	红	16	连鹤	白
6	花王	深银红	17	黑龙锦	墨紫
7	芳纪	火红	18	新扶桑	白
8	新日月	红	19	八千代椿	银红
9	红辉狮子	大红	20	吉野川	粉
10	花竞	粉	21	紫晃	粉
11	皇嘉门	黑紫			

1.2 DNA 提取

按照 CTAB 法提取牡丹基因组 DNA,操作流程如下:(1)在研钵中加入 100 mg 牡丹叶片样品和 700 μ L CTAB 提取液,充分研磨;(2)转移混合液至 1.5 mL 离心管中,65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,每隔 5 min 振荡混匀;(3)取出离心管,冷却到室温后,于 8 000 r/min 离心 2 min;(4)取出离心管,将上清液转移至 1.5 mL 离心管中,加入等体积三氯甲烷混匀,振荡 10 min;

收稿日期:2014-09-21
基金项目:江苏农业科技支撑计划(编号:BE2011445);江苏省大学生实践创新训练计划(编号:201310333032Y);江苏省苏州市科技计划(编号:SZS201102、SYN201110、SNG201323);苏州市吴江区科技计划(编号:WN201311、WN201317);江苏省常熟市科技计划(编号:CS201205)。
作者简介:孙嘉磊(1992—),男,江苏太仓人,研究方向为植物资源利用开发。
通信作者:杨志刚,硕士,副教授,从事天然产物研究与开发。Tel:(0512)52251562;E-mail:zhigangyang77@sina.cn。

(5)12 000 r/min 常温离心 10 min;(6)转移上清液至 1.5 mL 离心管中,加等体积异丙醇,混匀后静置 10 min,于 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 70% ~75% 乙醇漂洗沉淀 2 次,在超净工作台上吹干;(7)加 50 μ L ddH₂O,将沉淀 DNA 溶解后于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 引物信息

以张艳丽等对滇牡丹不同花色类群开发的 10 对 EST - SSR 引物^[9]作为本研究的候选引物(表 2),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。

表 2 10 对 EST - SSR 引物信息

引物名称	基元	引物序列	退火温度($^{\circ}$ C)	产物片段(bp)
P1	(CTC) ₄	F:5' - TGGCGCTCCACACGGTATCTT - 3' R:5' - ATCGTGTTCCGTTCCGCCGT - 3'	58.24 59.08	228
P2	(GCA) ₄	F:5' - TCGATGCCCGCAGGGTTTCT - ' R:5' - ACAGGTCTTGTC CGGCCTTGT - 3'	58.42 58.01	381
P3	(AAG) ₄	F:5' - TCCCAAAAGAGGGCGGTGCT - 3' R:5' - TCCCTCCGAAACGGCATGT - 3'	58.25 58.05	306
P4	(TTAA) ₃	F:5' - ATGGCGAGATTGCCCGTCT - 3' R:5' - TGCAGTCACCACCATCCGTCA - 3'	58.20 58.10	228
P5	(TCTCGC) ₃	F:5' - CGTCATACTGAACGCCGCCGA - 3' R:5' - TCACGTGGATGTTCACTGCCCA - 3'	59.85 58.76	208
P6	(AGA) ₅	F:5' - CGGCGTGCCTTTGAGACGTG - 3' R:5' - TGCCTCGAAAACTCGCCTTCTCC - 3'	58.91 59.48	157
P7	(CATTT) ₃	F:5' - AGCGTGAAGCAACAAGCCGTG - 3' R:5' - ACTGCGTTTCACGGCGAGGA - 3'	58.82 59.01	167
P8	(ACTGA) ₃	F:5' - AGCAGAGAAGGTAGGCGGCG - 3' R:5' - AGCGCTGAAGGCCAGTCATGG - 3'	58.59 59.45	171
P9	(CAC) ₄	F:5' - GGGGACTCAAATCCTTGCGAAAACCA - 3' R:5' - AGGCCTAGTTTTGCTCTGGGCG - 3'	59.68 58.83	189
P10	(GGT) ₄	F:5' - CAGCTGGCTTCCCACGCAGT - 3' R:5' - TAGCCATGCCGCCTCCACCT - 3'	59.63 59.97	177

1.4 SSR - PCR 扩增

20 μ L 反应液其中包括 10 \times PCR buffer、0.1 mmol/L dNTP、1 U *Taq* DNA 聚合酶、1.5 mmol/L Mg²⁺、50 ng DNA 模版和 0.3 μ mol/L EST - SSR 引物。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物选用 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,36 W 电泳 3 h。参考王凤格等的快速银染法^[11]并稍加修改:50% 乙醇、2.5% 冰乙酸组成的固定液固定 5 min;双蒸水快速漂洗 1 次;0.2% AgNO₃ 染色 5 min;1.5% NaOH、0.4% 甲醛组成的显影液显影;固定液定影。

1.5 数据分析

根据 EST - SSR 扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,观察稳定且易于辨别的差异性条带,选出具有多态性的引物,记录并进行统计分析,建立其 DNA 指纹图谱。统计每对引物扩增的条带数,计算多态性频率(frequency of polymorphism, FP)。用 Excel 计算物种间相似系数(GS)和遗传距离指数(D),根据所得遗传系数矩阵用 NTSYS2.1 软件进行统计分析并作聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 EST - SSR 标记多态性分析

10 对 EST - SSR 引物及相应产物片段信息见表 2。用 10 对 SSR 标记引物在 21 份供试品牡丹中共检测到 47 个多态性基因型(表 3),每对引物的基因型数不等,变幅为 1 ~ 11 个,平均 4.7 个,这些引物对所有供试材料的扩增结果重复性好、

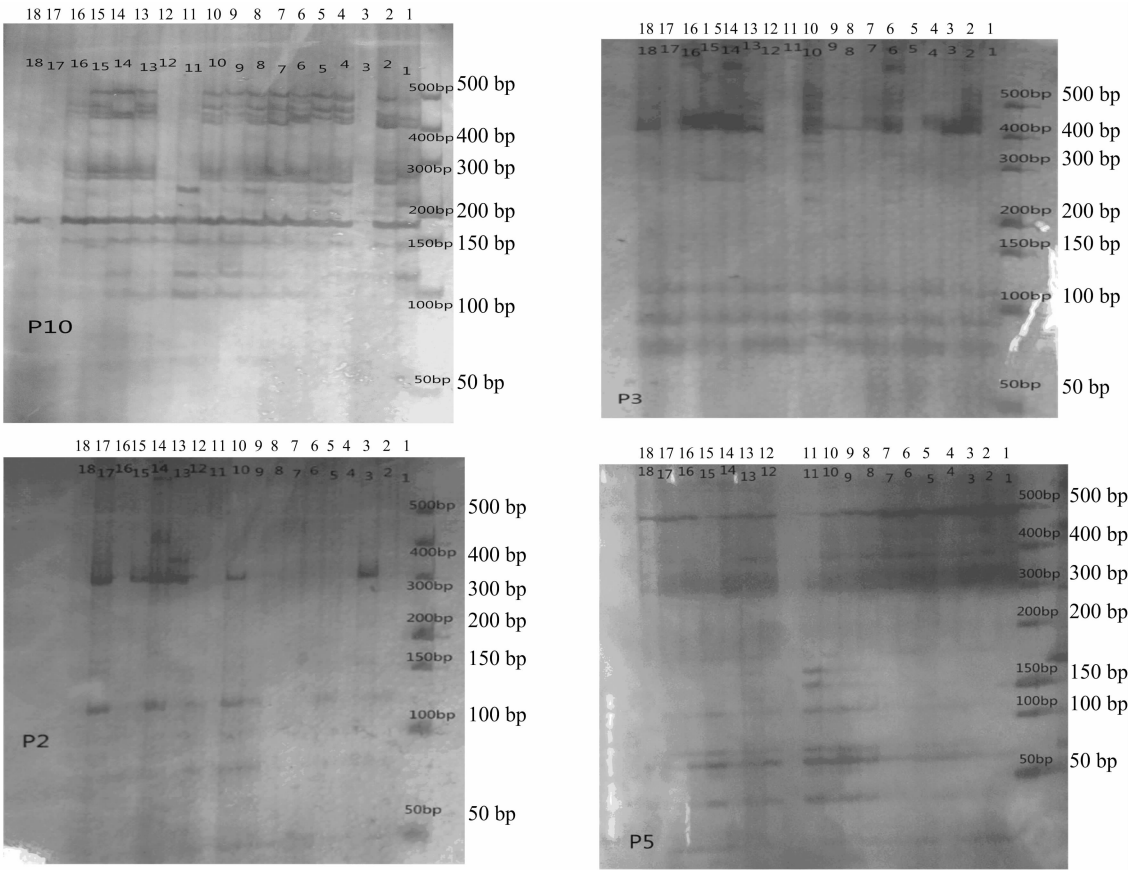
特异性高、条带清晰且多态性丰富(图 1)。其中引物 P10 扩增的基因型最多,为 11 个;P1 基因型最少,为 1 个,多态性最差。10 对 SSR 引物的 *FP* 值平均为 0.521,其中 *FP* 值最大为 P1 的 0.950,其次是 P6 的 0.607,最小为 P8 的 0.277。各标记的多态性存在明显的差异,多态性位点多且 *FP* 值越高,表明相应标记对牡丹品种的鉴别能力越好,如 P10。

表 3 EST - SSR 引物扩增的信息

位点	重复基元	基因型数(个)	<i>FP</i> 值
P1	(CTC) ₄	1	0.950
P2	(GCA) ₄	7	0.523
P3	(AAG) ₄	2	0.440
P4	(TTAA) ₃	3	0.467
P5	(TCTCGC) ₃	7	0.538
P6	(AGA) ₅	3	0.607
P7	(CATTT) ₃	7	0.349
P8	(ACTGA) ₃	4	0.277
P9	(CAC) ₄	2	0.523
P10	(GGT) ₄	11	0.542

2.2 DNA 指纹图谱分析

采用上述 10 对 EST - SSR 引物对 21 个品种进行指纹分析,挑选出多态性相对丰富的引物进行组合鉴别,选择 P5、P10 共 2 对核心引物进行组合就可将 21 份供试牡丹品种完全区分开(表 4)。其中用 P10 扩增出的特征谱带可鉴定出红辉狮子、百花选、芳纪、海黄、火鸟、新日月、岛大臣、金晃、黑龙



1—百花选; 2—火鸟; 3—花王; 4—芳纪; 5—新日月; 6—红辉狮子; 7—花竞; 8—皇嘉门; 9—岛大臣; 10—金晃; 11—海黄; 12—玉廉; 13—连鹤; 14—黑龙锦; 15—新扶桑; 16—八千代椿; 17—吉野川; 18—紫晃

图1 引物 P2、P3、P5 和 P10 在供试材料中的扩增结果

表 4 21 个牡丹品种的 DNA 指纹图谱

引物 编号	目的片段 大小(bp)	品种编号																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
P10	500	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
P10	447	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0
P10	405	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
P10	264	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
P10	230	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P10	185	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
P10	158	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
P10	130	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
P10	103	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
P5	425	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
P5	285	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
P5	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
P5	70	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

注:1 表示有电泳条带,0 表示无电泳条带。品种编号同表 1。

锦、八千代椿 10 个品种;用引物 P5 扩增出的特征谱带可区分鉴定出岛辉与日暮、岛锦与花王、花竞与连鹤、皇嘉门与新扶桑、玉廉与紫晃等。

2.3 遗传多样性分析

通过计算遗传系数矩阵,利用 NTsys 软件绘制聚类分析图(图 2),结果表明,21 个日本牡丹品种间遗传相似系数变

异范围在 0.21~0.84 之间。以遗传相似系数 0.55 为阈值,可以将 21 种牡丹品种分为 2 大类:第 1 类包括百花选、花竞、火鸟、红辉狮子、芳纪、连鹤、黑龙锦、新扶桑、新日月、岛大臣、金晃、黄嘉门和八千代椿共 13 个牡丹品种;第 2 类包括岛锦、岛辉、日暮、玉廉、海黄、紫晃、吉野川和花王 8 个牡丹品种。以遗传系数 0.65 为阈值,又可以将 21 个品种分为 5 个类群:

第 1 类群包括芳纪、连鹤、黑龙锦、新扶桑、新日月、岛大臣、金晃、皇嘉门和八千代椿 9 个品种;第 2 类群包括百花选、花竞、火鸟和红辉狮子 4 个品种;第 3 类群只有花王 1 个品种;第 4

类群包括海黄、紫晃和吉野川 3 个品种;第 5 类群包括岛锦、岛辉、玉廉和日暮 4 个品种。

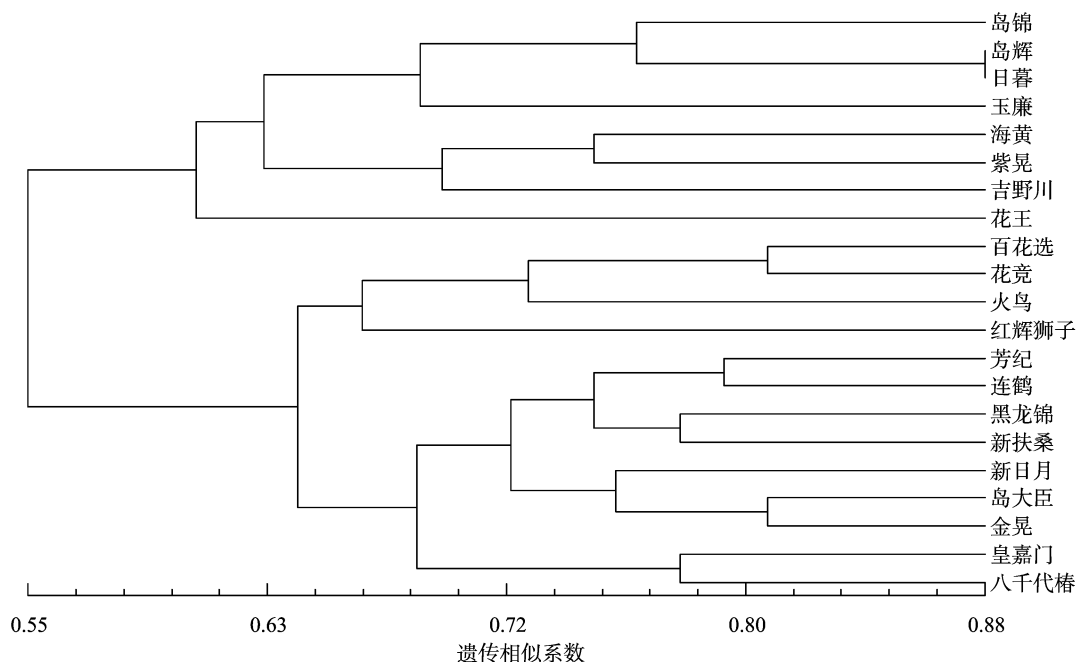


图2 21 个牡丹品种的遗传多样性聚类分析结果

3 讨论

本试验以中国常熟尚湖牡丹园引栽的日本牡丹品种为研究对象,拟构建尚湖牡丹园日本牡丹品种的 DNA 指纹数据库,在分子水平上给每个引栽品种 1 个能准确表明其身份的指纹信息,从而实现 DNA 指纹技术应用于牡丹品种鉴定、引种。引物组合法通过不同的有限组合,可以大大提高引物的鉴别能力^[12-13],本研究采用 2 对引物进行组合鉴别可将 21 份日本牡丹品种完全区分开,随着品种数量的进一步增加,这 2 个引物组合的鉴别能力可能会逐渐降低,可根据实际情况适当增加引物组合的数量。多对核心引物组合构建的指纹图谱相比 2 个引物组合所代表的 DNA 水平上的信息量更丰富、更全面、更准确,具有更强的品种鉴别能力,适用于更大牡丹品种 DNA 指纹数据库的构建需要。

本研究的遗传多样性分析表明,引栽的 21 个日本牡丹品种间的遗传相似系数介于 0.21 ~ 0.84 之间,品种间存在较复杂的遗传差异。聚类分析表明,百花选、花竞、火鸟、红辉狮子、芳纪、连鹤、黑龙锦、新扶桑、新日月、岛大臣、金晃、黄嘉门和八千代椿等品种聚合在一起,可能来自于同一起源;岛锦、岛辉、日暮、玉廉、海黄、紫晃、吉野川和花王等品种相互间亲缘关系较近。

参考文献:

[1] 朱红霞. 牡丹、芍药品种 DNA 指纹图谱绘制的初步研究[D]. 北京:北京林业大学,2004.
[2] Hosoki T, Kimura D, Hasegawa R. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. Journal of the Japanese

Society for Horticultural Science, 1997, 66(2): 393-400.
[3] UPOV. Guidelines for DNA - profiling; molecular marker selection and database construction//BMT Gridelines (proj.9) [M]. Geneva: UPOV, 2007: 3-4.
[4] 李保印. 中原牡丹品种遗传多样性与核心种质构建研究[D]. 北京:北京林业大学,2007.
[5] 王 森,于恒秀,龚志云,等. 芍药栽培品种 ISSR 反应体系的优化和应用[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2007, 28(2): 78-82.
[6] 林 玲,汤浩茹,刘燕,等. 观赏桃 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 生物技术通报,2009(12): 72-75.
[7] 郭大龙. 牡丹种质资源遗传多样性研究进展[J]. 北方园艺, 2007(9): 61-65.
[8] Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. Genome Research, 2001, 11: 1441-1452.
[9] 张艳丽,王 雁,李正红,等. 基于牡丹 EST 信息的滇牡丹 SSR 标记开发[J]. 林业科学研究, 2011, 24(2): 171-175.
[10] 成仿云,李嘉珏. 中国牡丹的输出及其在国外的发展 I: 栽培牡丹[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 1998, 34(1): 109-116.
[11] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 606-607.
[12] 徐海风,杨加银,程保山. 26 份菜用大豆品种(系)指纹图谱的构建及其遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 145-148.
[13] 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.