

张永侠, 缪 森, 原海燕, 等. 23 个德国鸢尾品种(系)的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 47–50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.012

23 个德国鸢尾品种(系)的 ISSR 分析

张永侠, 缪 森, 原海燕, 杨永恒, 刘清泉, 黄苏珍

(江苏省中国科学院植物研究所/南京中山植物园, 江苏南京 210014)

摘要:以 23 个德国鸢尾品种(系)为材料, 利用 ISSR 标记研究 23 份材料间的遗传多样性。结果表明, 10 条引物共获得 68 条清晰可辨的条带, 多态性条带为 61 条, 平均每条引物扩增出 6.8 条带, 多态性位点百分率为 89.7%; 23 个德国鸢尾品种(系)的平均有效等位基因数为 1.897 1, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.331 3, 平均 Shannon 信息指数为 0.491 1, 品种间的遗传相似系数(GS)范围在 0.375~0.850, 变幅为 0.475, 说明供试材料具有丰富的遗传多样性。UPGMA 聚类分析结果表明, GS 值 0.706 时, 23 个德国鸢尾品种(系)可聚为 5 类。利用 2 个 ISSR 引物 UBC814、UBC900 扩增谱带构建的指纹图谱可以把 23 个德国鸢尾品种(系)完全区分开。

关键词:德国鸢尾; 遗传多样性; ISSR; 指纹图谱

中图分类号: S682.1+90.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0047-04

德国鸢尾(*Iris germanica* L.)为鸢尾科鸢尾属多年生草本植物, 是世界著名的宿根花卉之一, 耐寒性强, 叶丛美观, 花朵硕大, 色彩艳丽, 具有较高的观赏价值, 世界各地广为栽培^[1]。德国鸢尾是栽培起源种, 并非 1 个野生种, 19 世纪末 20 世纪初美国成为德国鸢尾的杂交育种中心, 培育出许多有髯大花德国鸢尾品种^[2]。ISSR 是 1994 年 Zietkiewicz 等提出的一种新型分子标记技术^[3], 具有操作简单、稳定性高、多态性丰富等特点。目前, ISSR 分子标记已广泛应用于植物遗传多样性分析和品种鉴定^[4-8], 鸢尾属植物中也有相关报道。张敏等利用 RAPD 及 ISSR 标记分析来自不同产地的鸢尾属 4 个野生种的遗传关系, 结果表明, 鸢尾属种间遗传多样性较高, 且种间变异大于种内变异^[9]。童俊等采用 ISSR 标记研究 34 份鸢尾属园艺品种的遗传特性及亲缘关系发现, 多态性条带比例达 100%, 供试材料具有丰富的遗传多态性^[10]。

目前, 国内栽培的德国鸢尾大多引自国外, 自主培育的新品种还处于起步阶段。由于对引进品种的遗传背景不了解, 无法确定大部分栽培品种的亲缘关系, 且经过长期的人工栽培选育, 德国鸢尾存在较大的遗传分化, 采用传统的分类方法很难区分其种下类群及品种。因此, 运用现代分子生物学手段, 从分子水平上对德国鸢尾种质资源的亲缘关系和遗传多样性开展研究, 可为德国鸢尾种质资源的挖掘、创新及德国鸢尾育种中的有效利用提供依据。本研究利用 ISSR 分子标记技术, 对 23 个德国鸢尾品种(系)进行遗传多样性和亲缘关系研究, 旨在为德国鸢尾品种鉴定和杂交亲本选配提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 23 个德国鸢尾品种(系)均采集于江苏省中国科学院植物研究所鸢尾种质圃。12 个品种于 1997 年引自西安植物园, 引种编号分别为 122、128、129、239、266、269、246、247、252、261、127、267, 5 个品种 93E41076-8、93E41076-10、93E41078-17、93E41076-17、201425 于 1993 年引自美国, 另有 6 个为江苏省中国科学院植物研究所培育的新品种(系), 分别为 2013001、黄金甲、幻舞、风烛、2010141、金舞娃(表 1)。每个品种(系)采集 1 棵单株的嫩叶, 置于液氮中, 带回实验室-80℃冰箱中保存, 备用。

参考加拿大哥伦比亚大学(UBC)的引物设计 ISSR 引物, 并由上海捷瑞生物工程有限公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Marker、10×PCR buffer 等购于宝生物工程(大连)有限公司; EDC-810 型-PCR 扩增仪为东盛公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取与检测 采用 CTAB 法^[11]提取基因组 DNA; 核酸仪检测 DNA 质量和浓度, 并稀释至 50 ng/μL。

1.2.2 引物筛选 扩增反应在 EDC-810 型-PCR 仪上进行, 用 2 个 DNA 样品分别对 31 条 ISSR 引物进行筛选, 选择扩增稳定、清晰条带的引物进行正式扩增。

1.2.3 反应体系和扩增程序 通过对模板 DNA 浓度、Mg²⁺、dNTPs、*Taq* 酶及退火温度等试验, 得到 2 种标记的最适反应体系和扩增程序。ISSR 反应体系 25 μL: *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、模板 DNA 50 ng、10×PCR buffer 2.5 μL、Mg²⁺ 1.5 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、引物 0.4 μmol/L, 用 ddH₂O 补足到所需体积。扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 53℃退火 45 s, 72℃延伸 120 s, 38 个循环; 72℃延伸 10 min。ISSR 的 PCR 产物用质量分数 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 电泳时电压为 5 V/cm; 电泳结束, 在上海天能科技有限公司生产的凝胶成像系统仪上观测分析并拍照。

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 江苏省科技支撑计划(编号: BE2012349)。

作者简介: 张永侠(1987—), 女, 安徽阜阳人, 硕士, 初级实验室助理, 主要从事观赏植物遗传育种研究。Tel: (025) 84347086; E-mail: zhangyongxia8712@163.com。

通信作者: 黄苏珍, 博士, 研究员。E-mail: hsz1959@163.com。

表 1 供试的 23 个德国鸢尾品种(系)情况

编号	品种	花色	株高 (cm)	来源
1	122	垂瓣紫色,旗瓣浅紫色	30~50	西安植物园
2	128	垂瓣蓝紫色,旗瓣浅紫色	30~50	西安植物园
3	129	垂瓣紫红色,旗瓣黄色	30~50	西安植物园
4	93E41076-8	白色	30~40	美国
5	93E41076-10	深紫	30~40	美国
6	93E41078-17	白色带紫边	40~60	美国
7	239	黄色	40~60	西安植物园
8	266	红色	30~50	西安植物园
9	269	白色	40~60	西安植物园
10	201425	粉色	40~60	美国
11	金舞娃	黄色	50~70	本所培育
12	2013001	紫色	50~70	本所培育
13	93E41076-17	白色带紫边	50~70	美国
14	黄金甲	黄色	80~90	本所培育
15	幻舞	蓝紫	50~70	本所培育
16	风烛	深红	40~60	本所培育
17	246	浅紫	40~60	西安植物园
18	247	垂瓣紫红色,旗瓣黄色	50~60	西安植物园
19	252	垂瓣紫色,旗瓣浅紫色	80~90	西安植物园
20	261	垂瓣红色,旗瓣浅红色	50~70	西安植物园
21	127	浅紫	80~90	西安植物园
22	267	垂瓣黄色,旗瓣浅紫色	10~15	西安植物园
23	2010141	垂瓣紫红色,旗瓣黄色	50~70	本所培育

1.3 数据记录与分析

记录清晰可重复的 DNA 电泳条带,对同一引物的扩增产物,迁移率相同的条带记为 1 个位点,同一位点上有条带记为“1”,无条带记为“0”;运用 NTSYS-PC 2.10e 版软件计算供试材料的遗传相似系数,进行 UPGMA 聚类分析;采用 POP-GEN 1.32 软件计算 Shannon 信息多样性指数(I)、Nei's 基因多样性指数(H_e)及观察有效等位基因数(N_e)。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性

从 31 条 ISSR 引物中筛选出 10 条扩增条带清晰、重复性高的引物,图 1 为 ISSR 引物 UBC880 对 23 个德国鸢尾品种的 ISSR-PCR 扩增电泳。由表 2 可见,10 条 ISSR 引物共扩增出 68 条清晰可辨条带,其中多态性条带为 61 条,平均多态性比率为 89.7%,扩增的 DNA 片段集中在 150~2 000 bp 之

间,平均每对引物扩增出 6.8 条带,其中 6.1 条具有多态性;多态性最高的为 100%,低的只有 75.0%。23 个德国鸢尾品种(系)的 GS 值为 0.375~0.850,变幅为 0.475,不同引物的扩增产物呈现的多态性水平有较大差异。

2.2 德国鸢尾品种(系)的遗传多样性分析

通过对 23 个德国鸢尾品种(系)群体遗传参数进行计算,结果表明,23 个德国鸢尾品种(系)平均有效等位基因数为 1.897 1,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.331 3,平均 Shannon 信息指数为 0.491 1,这表明 23 个德国鸢尾品种(系)间存在丰富的遗传多样性。

2.3 23 个德国鸢尾品种(系)的聚类分析

以 23 个德国鸢尾品种(系)的 68 条谱带数据建立遗传相似系数矩阵,其中,品种 269 与 239 间的遗传相似系数相对最大,为 0.850;品种 93E41076-17、93E41078-17 与 127 间的遗传相似系数相对最小,仅为 0.375。根据遗传相似系数

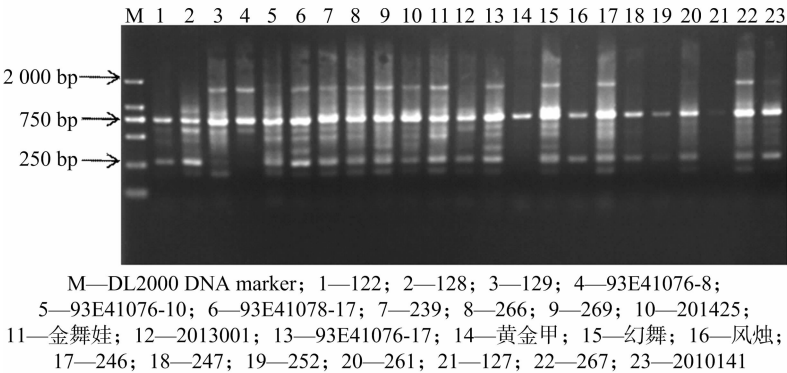


图1 ISSR 引物 UBC880 对23个德国鸢尾品种的 ISSR-PCR 扩增电泳图

表 2 10 条 ISSR 引物扩增结果

引物	序列 5'→3'	片段大小 (bp)	扩增总带数 (条)	多态性条带数 (条)	多态性百分比 (%)
UBC802	(AT) ₈ G	250 ~ 1 800	8	6	75.0
UBC 814	(CT) ₈ A	500 ~ 2 000	6	6	100.0
UBC 819	(CT) ₈ A	500 ~ 1 500	3	3	100.0
UBC 822	(TC) ₈ A	250 ~ 2 000	9	8	88.9
UBC 826	(AC) ₈ C	300 ~ 1 200	7	6	85.7
UBC 828	(TG) ₇ A	250 ~ 1 500	5	4	80.0
UBC 880	(GGAGA) ₃	150 ~ 1 800	7	6	85.7
UBC 881	(GGGTG) ₃	250 ~ 2 000	11	10	90.9
UBC 899	CATGGTGTGGTTCATGTTCCA	500 ~ 1 500	5	5	100.0
UBC 900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	300 ~ 1 800	7	7	100.0

矩阵,采用 UPGMA 法构建供试 23 个德国鸢尾品种(系)的聚类图。由图 2 可见,于遗传相似系数 0.706 处可将 23 个供试品种分为 I、II、III、IV、V 类;I 类共包含 16 个品种(系),包括 4 个矮型小花品种 122、128、266、129,2 个矮型大花品种 93E41076-8、93E41076-10,10 个中型大花品种(系)239、269、201425、金舞娃、幻舞、2013001、246、261、93E41076-17、93E41078-17,其中白色品种 239 和黄色品种 269 之间的遗传相似系数达到 0.850,表明这 2 个品种具有较高的同源性;自主选育的花大色艳的黄色品种金舞娃、深紫色品种幻舞、紫色品系 2013001 这 3 个品种(系)的植株形态极其相似,被聚

在一起,三者间的两两遗传相似系数平均为 0.805,处于较高水平,表明这 3 个品种(系)也具有较高的同源性;II、III 类均只包含 1 个品种,II 类为自主选育品种黄金甲,该品种外花瓣基部有红褐色条纹,观赏性较高,III 类为品种 267,极矮品种,株高只有 10~15 cm,外花瓣黄色,内花瓣淡紫色,花色艳丽,观赏性极高,且是培育矮生德国鸢尾的重要亲本;IV 类包含 247、风烛、2010141 这 3 个品种(系),其中风烛为自主选育品种,花型奇特,为极其少见的黑红色重瓣;V 类包含 252、127 这 2 个品种,均为高型淡紫色系品种,但两者的遗传相似系数不大。

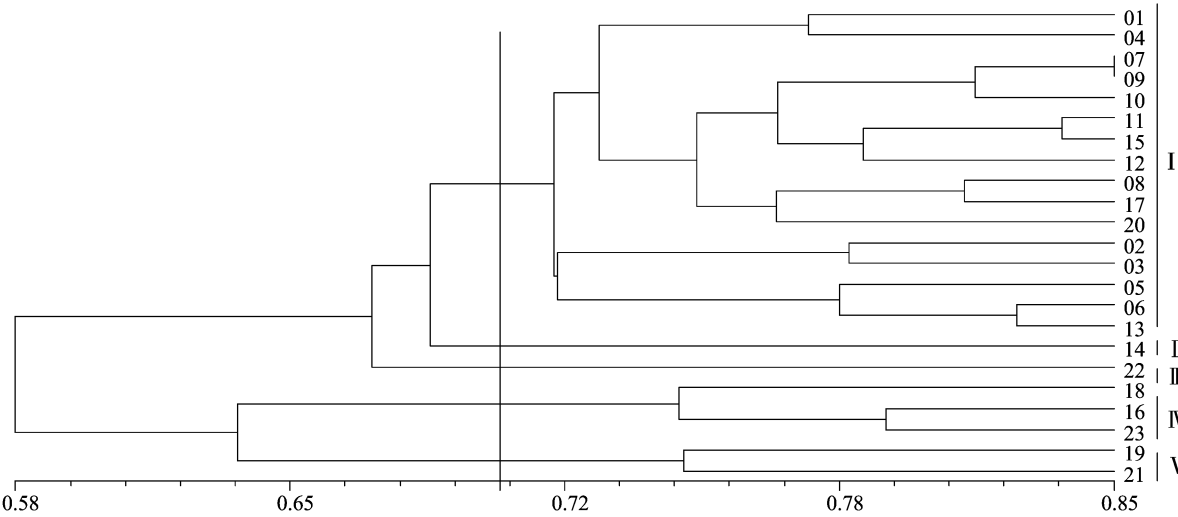


图2 23个德国鸢尾品种(系)的 UPGMA 聚类图

2.4 23 个德国鸢尾品种(系)的 ISSR 指纹图谱构建

根据每个品种 DNA 扩增图谱中 ISSR 标记位点条带的有无或缺失,分别用 0、1 进行数字化统计,形成由 0、1 排列的字符串,构成 1 个数字指纹图谱。由表 3 可见,由引物 UBC814、UBC900 构建的数字指纹图谱,可以快速鉴定出 23 个德国鸢尾品种(系)。

3 结论与讨论

德国鸢尾的栽培品种遗传背景复杂,现在栽培的德国鸢尾至少是有 10 个以上亲本的园艺杂种^[12]。因此,了解德国鸢尾种质资源遗传变异信息及亲缘关系远近,是培育优良品种的基础。本研究通过 10 条 ISSR 引物共在 23 个德国鸢尾

品种(系)中扩增出 68 个清晰可辨位点,其中多态性位点有 61 个,多态位点百分率达 89.7%;23 个德国鸢尾品种的 Nei's 遗传多样性指数为 0.331 3,遗传相似系数为 0.491 1,这说明德国鸢尾品种具有较为丰富的遗传多样性。

ISSR 聚类分析表明,23 种德国鸢尾品种(系)被划分为 5 类,但并没有按照花色或花型聚类,而是形态相似的品种被聚到 1 类,这表明基于 ISSR 标记对德国鸢尾品种(系)进行遗传多样性分析是可行的。自主选育的品种黄金甲和极矮生品种 267 分别被独自聚为 1 类,说明这 2 个品种与其他品种遗传距离相对较远;唯一的畸形重瓣品种风烛与 247、2010141 聚到 1 类,252 和 127 形态特征相似,也被聚到 1 类。

花卉品种鉴定的方法主要依靠表型特征,虽然便捷,但是

表 3 引物 UBC814、UBC900 构建 23 个德国鸢尾品种(系)的特征数字指纹

品种	标记位点												
	UBC814 – 2000	UBC814 – 1900	UBC814 – 1200	UBC814 – 750	UBC814 – 700	UBC814 – 600	UBC900 – 1500	UBC900 – 1200	UBC900 – 900	UBC900 – 750	UBC900 – 600	UBC900 – 500	UBC900 – 3000
122	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
128	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
129	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
93E41076 – 8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
93E41076 – 10	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
93E41078 – 17	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
239	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
266	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
269	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
201425	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
金舞娃	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
2013001	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
93E41076 – 17	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
黄金甲	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
幻舞	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
风烛	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
246	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
247	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
252	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
261	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
127	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
267	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2010141	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1

表型性状受环境影响较大,鉴别错误率较高,加之花卉品种资源逐年扩大,品种的相似度也越来越高,导致通过传统的表型鉴定方法来区分品种越来越难^[13]。由于遗传物质 DNA 受环境影响较小,且多态性高,基于 DNA 扩增的分子标记成为花卉品种鉴定的有效方法,目前,已在丽穗凤梨、朱顶红、菊花、景东报春等花卉中构建了分子指纹图谱^[5,13-15]。本研究利用引物 UBC814、UBC900 谱带构建的指纹图谱可将 23 种德国鸢尾品种(系)全部区分开来,说明 ISSR 是一种构建德国鸢尾种质资源指纹图谱的理想标记。

参考文献:

[1]那伟民. 德国鸢尾栽培技术[J]. 中国花卉园艺,2007(16):29.
[2]王振一. 德国鸢尾的栽培技术[J]. 河北林果研究,2005,20(3):291-293.
[3]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
[4]张 林,徐迎春,成海钟,等. 基于 ISSR 标记的 62 个朱顶红品种的遗传关系分析及指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(4):48-54.
[5]雒新艳,王 晨,戴思兰,等. 基于 ISSR 标记的大菊品种资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2013,46(11):2394-2402.
[6]刘 君,赵 琴,杨志民. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定分

析[J]. 草业学报,2012,21(6):159-165.
[7]Izzatullayeva V, Akparov Z, Babayeva S A, et al. Efficiency of using RAPD and ISSR markers in evaluation of genetic diversity in sugar beet[J]. Turkish Journal of Biology,2014,38(4):429-438.
[8]Namita, Panwar S, Sonah H, et al. Genetic diversity analysis of marigold (*Tagetes* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences,2013,83(5):8-14.
[9]张 敏,黄苏珍,仇 硕,等. 鸢尾属植物遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(2):6-11.
[10]童 俊,周 媛,毛 静,等. 鸢尾属部分园艺品种遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 北方园艺,2015(10):104-107.
[11]Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications [J]. Plant Molecular Biology Reporter,1999,17(1):53-57.
[12]赵毓棠. 鸢尾欣赏与栽培利用[M]. 北京:金盾出版社,2005.
[13]葛亚英,张 飞,沈晓岚,等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2012,45(4):726-733.
[14]缪恒彬,陈发棣,赵宏波,等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2008,41(11):3735-3740.
[15]Xue D W, Ge X J, Hao G, et al. High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *primula interjacens* by ISSR analysis [J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(10):1163-1169.