

高鹏华,于文剑,赵芮,等. 基于 ISSR 标记的藤本月季品种遗传多样性及其分子身份证的构建[J]. 江苏农业科学,2019,47(18):98–101.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.020

基于 ISSR 标记的藤本月季品种遗传多样性 及其分子身份证的构建

高鹏华,于文剑,赵芮,熊阳阳,王锦

(西南林业大学园林学院,云南昆明 650224)

摘要:38 个藤本月季品种 ISSR 分子标记结果表明,23 条引物共扩增出 212 个多态性位点,多态性比率高达 72.35%。基因分化系数 GS 值变化范围在 0.755~0.971,变化幅度较小,品种亲缘关系较近。38 个藤本月季品种的群体遗传参数中平均观测等位基因数为 1.9735,平均有效等位基因数 1.5781,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.3726,平均 Shannon's 信息指数为 0.5723。38 个品种间的遗传分化系数(G_{st})为 0.7856,基因流(N_m)为 0.0584,表明 38 个品种遗传多样性丰富。由聚类分析图可知,38 个品种可聚为 3 个大类 7 个分支。以 23 条引物中多态性较好且能区分这 38 个供试品种的 17 条引物对不同品种扩增条带进行统计,建立了 38 个藤本月季品种的分子身份证。

关键词:藤本月季;ISSR 标记;亲缘关系;遗传多样性;分子身份证

中图分类号:Q311;**文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)18-0098-04

藤本月季(climber, CL)是现代月季的一个重要支系,枝长,蔓性生长,花大,1 季或 4 季开花^[1]。因其攀援和观赏特性,藤本月季在观赏园艺中占有重要的地位。ISSR 分子标记技术是一种简单、快速、高效的研究植物遗传多样性与亲缘关

收稿日期:2018-05-08

基金项目:国家林业局“948”项目(编号:2014-4-19);云南省高校林下生物资源保护及利用科技创新团队资助项目。

作者简介:高鹏华(1993—),女,河南濮阳人,硕士,研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail:786987934@qq.com。

通信作者:王锦,博士,教授,研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail:908505685@qq.com。

系的分子标记方法,已广泛应用于狗牙根、红麻、油茶、大菊等植物的遗传多样性与分类鉴定研究。周俐宏等利用筛选出的 11 条 ISSR 引物对 3 种月季类型的 23 份月季材料进行遗传多样性分析,表明月季种质的遗传差异与其应用分类的相关性不紧密^[2]。杨帆等利用 ISSR 分子标记结合形态学指标对 17 份蔷薇属植物进行亲缘关系研究,结果表明形态学聚类与 ISSR 聚类结果基本一致^[3]。季春娟利用 ISSR 分子标记技术对 17 种蔷薇属植物进行遗传关系研究,表明 17 份供试材料遗传多样性较高^[4]。刘燕运用 ISSR 和 RAPD 分子标记技术对 13 个观赏桃品种进行遗传多样性鉴定,结果表明与依据形态学分类结果较一致^[5]。刘君等对 9 份狗牙根进行鉴定分析

[15] 刘彤. 橡胶树木质素合成相关 MYB 基因的功能鉴定[D]. 海口:海南大学,2015.

[16] McCarthy R L, Zhong R, Fowler S, et al. The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(6):1084–1090.

[17] Qin Y, Wang M, Tian Y, et al. Over-expression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(6):7183–7192.

[18] Yang A, Dai X, Zhang W H. A R2R3-type MYB gene, *OsMYB2*, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2541–2556.

[19] Feng C P, Andreasson E, Maslak A, et al. *Arabidopsis MYB68* in development and responses to environmental cues [J]. Plant Science, 2004, 167(5):1099–1107.

[20] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, et al. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2004, 37(1):115–127.

[21] Kirik V, Lee M M, Wester K, et al. Functional diversification of *MYB23* and *GLI* genes in trichome morphogenesis and initiation [J]. Development, 2005, 132(7):1477–1485.

[22] Kim J H, Nguyen N H, Jeong C Y, et al. Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of the *SOS1* and *SOS3* genes in response to high salinity in *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(16):1461–1465.

[23] Verma N, Burma P K. Regulation of tapetum-specific A9 promoter by transcription factors AtMYB80, AtMYB1 and AtMYB4 in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* [J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2017, 92(3):481–494.

[24] Stracke R, Jahns O, Keck M, et al. Analysis of production of flavonol glycosides – dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11 – , MYB12 – and MYB111 – independent flavonol glycoside accumulation [J]. The New Phytologist, 2010, 188(4):985–1000.

[25] Chen Y, Chen Z, Kang J, et al. *AtMYB14* regulates cold tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31:87–97.

[26] 徐珏. 转录因子 AtMYB13 抑制拟南芥防卫反应的研究[D]. 南京:南京农业大学,2009.

并建立了指纹图谱^[6]。刘振等以 ISSR、SSR、RAPD 3 种分子标记方法对茶树进行分析,结果表明 ISSR 分子标记多态性较高^[7]。郑海燕等以红麻为材料,运用 ISSR 和 RAPD 分子标记方法对其分子身份证件进行构建^[8]。因此,运用 ISSR 分子标记技术对藤本月季遗传多样性亲缘关系研究是可行的。

藤本月季品种资源丰富,品种间亲缘关系复杂,为品种的保护和利用带来一定的困难。我国自 20 世纪末引进藤本月季以来,对于藤本月季引种、快繁技术、生长特性及抗逆性的研究不断深入,但对其分子层面的研究尚处于空白状态。因此,本研究以 38 个藤本月季品种为材料,运用 ISSR 分子标记技术对其亲缘关系进行聚类分析,以期为藤本月季杂交育种和品种保护提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的 38 个藤本月季材料来源于西南林业大学藤本月季资源圃及校园内绿化藤本月季品种,具体为 Celme Forestier、The Wedgwood Rose、Handel、Abraham Darby、Glorie de Dijon、Souvenir du Doctor、Alchymist、Aloha、Eden Rose、Super Excelsa、Lady Hillingdon、Sir Paul Smith、Uetersen、Red Eden Rose、Bienvenue、Alfred Colomb、Phyllis Bide、Purple Skyliner、Giardina、Paul Transon、Pippin、Spirit of Freedom、Coral Dawn、Salammbo、Ginger Syllabub、Soleil Vertical、Granham Thomas、Papi Delbard、Clarence House、Moyesii Geranium、Cinderella、Blue Rambler、Parade、Hagoromo、Angela、*Rosa multiflora* f. *carnea*、*R. multiflora* var. *platyphylla*、*R. multiflora* var. *cathayensis*。

根据不列颠哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列合成 ISSR 引物,通过筛选,最终确定 23 条 ISSR 引物用于供试样品扩增。

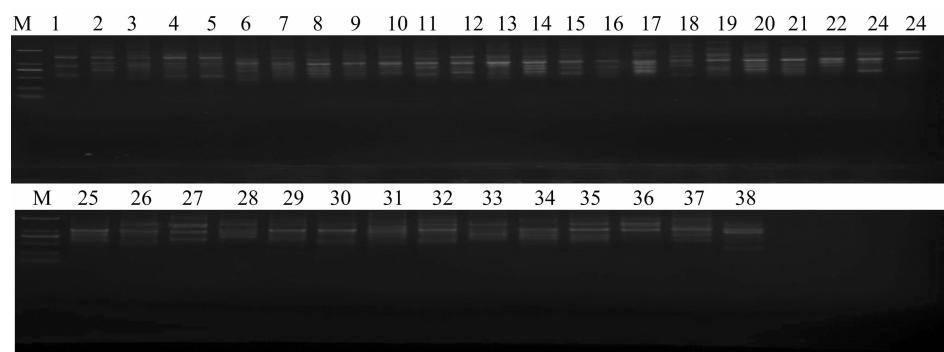


图1 ISSR 引物 UBC 866 扩增图谱

2.2 ISSR 聚类分析与遗传多样性分析

利用 Popgene 1.32 软件计算出 38 个不同品种之间的 Nei's 基因多样性指数(*H*)以及 Shannon's 信息指数(*I*)。结果表明,38 个藤本月季品种的平均 Nei's 基因多样性指数为 0.270 5,平均 Shannon's 信息指数为 0.406 9。38 个品种间的遗传分化系数(*G_{st}*)为 0.785 6,基因流(*N_m*)为 0.136 4。遗传分化系数可以说明总遗传变异 78.56% 来自品种间。由此可知,38 个藤本月季品种间的遗传分化水平较高,而基因交流频率较低。

由图 2 可知,38 个供试材料共可分为 3 个大类 7 个较大

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 本试验采用 Omega 试剂盒对藤本月季总 DNA 进行提取,贮存于 -20 ℃ 备用。

1.2.2 PCR 扩增 引物由上海生物技术有限公司进行合成。23 条引物为 UBC 813、814、815、818、825、827、828、829、830、831、834、840、841、843、844、845、846、858、859、862、866、880、884。

PCR 反应为 20 μL 体系:10 × PCR Buffer 2 μL, DNA 模板 2 μL, 上下游引物各 1 μL, dNTP 1.5 μL, Taq 酶 1.5 μL, ddH₂O 12 μL 补足 20 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s, *T_m* 值 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环;72 ℃ 10 min。

1.5% 琼脂糖凝胶检测,利用 Quantity One 软件分析电泳凝胶图,有条带记为“1”,无条带记为“0”,进行聚类分析,运用 Popgene 软件进行遗传多样性分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 条带和多态性分析

23 条 ISSR 引物对共扩增出 293 条带,其中多态性条带为 212 条,多态性比率为 72.35%,每条引物扩增出 5~11 条多态性谱带,平均每条引物扩增出 12.74 条多态性条带。23 条引物扩增出的条带在 500~2 000 bp 之间,不同引物在同一植物材料上扩增的条带数量和扩增片段大小不同,表明不同引物与模板 DNA 的结合位点不同,同一引物在不同品种间的扩增条带也不同,如在用引物 UBC 866 对这 38 个品种进行扩增时,Blue Rambler 存在条带的特异性缺失,Angela 的特异性扩增等(图 1)。23 条 ISSR 引物的平均多态性比率为 73.7%,多态性比率为 56%~92%。这些都反映了藤本月季品种间的多态性差异。对比 23 条 ISSR 引物,其中 20 条为二核苷酸重复序列,2 条三核苷酸重复序列,1 条为五核苷酸重复序列,表明 38 份供试材料中二核苷酸重复序列多。

分支。Salammbo 与 Angela、Bienvenue、Soleil Vertical、Souvenir du Doctor、Sir Paul Smith、Alfred Colomb、Abraham Darby、Clarence House、Ginger Syllabub、Eden Rose、Red Eden Rose 12 个品种聚为一类,其中 Red Eden Rose 与其他品种的遗传距离最远单独成为一支,Soleil Vertical、Alfred Colomb、Abraham Darby、Bienvenue 4 个品种的亲缘关系较其他品种近聚为一小支;Parade、Glorie de Dijon、Lady Hillingdon、Uetersen、*R. multiflora* f. *carnea*、Spirit of Freedom 同 Coral Dawn 7 个品种被分为一大支,根据相对遗传距离远近,Glorie de Dijon 被分在最外面一支,Parade 与 Lady Hillingdon、*R. multiflora* f.

ID = Lady Hillingdon
 111101101111111011111001111001001111100
 111111101011011110101111110111011101
 ID = Handel
 1011011011111111110110101100101111100
 11111110011111111101111101111011101
 ID = Super Excelsa
 101001101101110110111101010111101011111
 11010110011111110101111100101101101
 ID = Abraham Darby
 11010111011111111110100111111011111100
 1111011000110111111111011111111101
 ID = Salammbo
 1111110101111101011001101011101001011100
 011111111100101111010101100101111101
 ID = Phyllis Bide
 1011111101111101011101100001101001101110
 11010110011111110101111101101111101
 ID = Purple Skyliner
 10110111110010111100110101100101111100
 1111011001101111110001011101011101
 ID = Alchymist
 11010110111101011000001111001001111110
 1101011001101111000101101101111101
 ID = Souvenir du Doctor
 1011111011000100111001000111011011111100
 11111111111001011011001111011101111101
 ID = Glorie de Dijon
 1111111011110101111111011011110011111100
 011101111011000111101111111111110001
 ID = Uetersen
 1010011011111011110010010110110011111100
 111111101111100111101111111111111101
 ID = Eden Rose
 1111011011111100011001101011110111111100
 111111101111001111101011111111111111001
 ID = Sir Paul Smith
 11110100111111010110011011111011011111100
 1111111001110001111001111111111111101
 ID = Cinderella
 111001111100110111100100011111001101101100
 11111111111001111110101111111111111101
 ID = Blue Rambler
 011111101111010111101101000111001101110
 1111011011101111101010111100110100111
 ID = Parade
 101101111111101111100100111001011111100
 010111100111000110101111111101100100
 ID = Moyesii Geranium
 1110111010010010010010010101010111111100
 010111111100011111101110100111110011001110

3 讨论与结论

自 PCR 技术发明以来,运用 PCR 技术对动植物的遗传多样性进行分析已经成为最主要的一门技术。运用 ISSR 分子标记技术对植物的遗传多样性进行分析对样本的 DNA 浓度要求不高,而且操作简单,价格低廉,试验结果的可重复性高,结果稳定。赵凯歌在对腊梅属种质资源进行 ISSR 鉴定时发现,ISSR 重复性高达 99.08%^[9]。本试验同样获得了较高的重复性。在运用分子标记对植物的亲缘关系进行分析方面,前人的研究都取得了一定的成果。本试验以 38 个藤本月季品种为材料,研究表明 38 份材料根据 ISSR 分子标记多态性分类结果与其形态学观赏特性分类存在一定的差异,如在遗传相似系数为 0.947 时,可将 Soleil Vertical 与 Souvenir du Doctor, Sir Paul Smith 与 Alfred Colomb 分别分为 2 组,但 Soleil Vertical 的花为深黄色,半重瓣, Souvenir du Doctor 的花酒红色,半重瓣。因此,本试验的研究结果与夏至等对蔷薇科植物的研究结果即蔷薇属植物的遗传多样性较高^[10]一致。同时本试验结果表明,在对藤本月季分类时不能简单地依靠其形态学表现进行分类。

对所筛选出的多态性较高的引物分析表明,二核苷酸重复序列较多,其中 A、C 或 A、G 及 C、T 组合的多态性较高,这与杨帆利用 ISSR 对 17 份蔷薇属植物亲缘关系的研究中发现富含 AC、AG 组合的二核苷酸重复序列多态性较高结果^[3]一致。表明在对蔷薇属特别是月季品种之间亲缘关系鉴定选用富含 AG、AC 或 AT 组合的引物是可取的。

通过对 38 个藤本月季品种的遗传多样性的分析及分子身份证件的构建,可以为今后藤本月季的遗传育种及其开花机理,花色、花型等方面进行深入研究提供一定的基础数据。同时,对藤本月季的新品种的鉴定和保护提供理论方法的借鉴,可以更加快速地对未知品种进行认定。

参考文献:

- [1] 朱秀珍,张佐双. 中国月季 [M]. 北京:中国林业出版社,2006:1–4.
- [2] 周俐宏,张金柱,李振,等. 利用 ISSR 揭示不同类型月季遗传多样性[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(2):311–315.
- [3] 杨帆,曾丽,叶康,等. 17 份蔷薇属植物的亲缘关系的形态和 ISSR 分析[J]. 植物研究,2011(2):193–198.
- [4] 季春娟. 部分蔷薇属种质资源亲缘关系 ISSR 分析及‘平阴玫瑰’的适应性种植[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [5] 刘燕. 利用 RAPD 和 ISSR 技术对 13 个观赏桃品种的遗传多样性分析[D]. 雅安:四川农业大学,2011.
- [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] 刘振,赵洋,杨培迪,等. SSR、SRAP、ISSR 分子标记在茶树品种亲本鉴定上的比较分析[J]. 茶叶科学,2014(6):617–624.
- [8] 郑海燕,粟建光,戴志刚,等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证件[J]. 中国农业科学,2010(17):3499–3510.
- [9] 赵凯歌. 用形态标记和分子标记研究腊梅栽培种质的遗传多样性[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [10] 夏至,周艳,王璐静,等. 月季花、玫瑰及其近缘种 ISSR 分析与鉴定[J]. 中草药,2016,47(24):4433–4438.