

部分矮牵牛品种亲缘关系的 SRAP 分析

徐进¹, 张西西^{1,2}, 董爱香², 王涛², 赵梁军^{1*}

(¹中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193; ²北京市园林科学研究所, 北京 100102)

摘要: 利用 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 技术对部分矮牵牛品种进行亲缘关系分析。采用 88 对引物对我国栽培的 58 个矮牵牛品种进行扩增, 从中筛选到 20 个多态性较高的引物组合, 共产生 389 条多态性条带, 平均每个引物组合产生 19.5 个多态性条带, 每个引物组合分别产生 13~40 个扩增带, Jaccard's 相似系数在 0.55~0.87 之间。在遗传距离为 0.67 处可将 58 个品种分为 4 个类群, 第 1 类群主要为暖色系列的品种, 第 2 类群为黄色花品种, 第 3、4 类群为冷色花品种, 白色花品种聚类较散。

关键词: 矮牵牛; SRAP; 亲缘关系

中图分类号: S 681 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 12-1837-06

Genetic Relationship of Some Cultivars of Petunia Hybrids Using SRAP Marker

XU Jin¹, ZHANG Xi-xi^{1,2}, DONG Ai-xiang², WANG Tao², and ZHAO Liang-jun^{1*}

(¹Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²Beijing Institute of Horticulture and Gardening, Beijing 100102, China)

Abstract: In this paper, the molecular marker system-SRAP (sequence-related amplified polymorphism) was firstly applied on 58 petunia hybrids' genetic relationship research. The results obtained was as follows: 20 primer pairs selected from 88 primer pairs amplified 389 polymorphic bands with an average of 19.5 polymorphic bands per primer pair, and the number of bands amplified by each primer pair was ranged from 13 to 40. Moreover, Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.55 to 0.87. Fifty-eight cultivars could be divided into 4 groups when the genetic distance was 0.67. The first group mainly included warm colour serieses, and yellow flower cultivars were in the second group, while cold colour cultivars were clustered in the third and fourth group. In addition, the white colour cultivars were clustered in a wide range.

Key words: *Petunia hybrida*; SRAP; genetic relationship

矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.) 原产南美洲。目前我国常见的矮牵牛栽培品种有 80 余个, 花色极为丰富。尽管矮牵牛不同品种在叶片大小、花形花色、花朵直径、植株高度等方面具有差异, 但无法通过形态指标来判断品种间的亲缘关系, 这为矮牵牛的栽培利用和遗传改良带来了不便。

Cemy 等 (1996) 利用 DAF (DNA-amplification fingerprinting) 技术分析了矮牵牛 5 个种和 10 个栽培品种之间的亲缘关系, 并将供试材料进行区分。我国对矮牵牛品种演化与亲缘关系的研究较少。对观赏植物进行亲缘关系分析的 DNA 分子标记技术主要有 RAPD 和 AFLP, 但由于 RAPD 的重复性较差, AFLP 操作复杂且成本较高, 应用受到限制, 而相关序列扩增多态性 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 技术可以弥补上述不足。

SRAP 技术的原理是利用特定引物对 ORFs 区域 (open reading frames) 进行扩增。上游引物长 17

收稿日期: 2008-06-06; 修回日期: 2008-10-21

基金项目: 北京市科委重大项目 (D070500340121)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhaolj5073@163.com)

bp, 5端的前 10 bp是填充序列, 紧接着是 CCGG组成核心序列及 3端 3个选择碱基, 对外显子进行选择扩增, 下游引物长 18 bp, 5端的前 11 bp是一段填充序列, 紧接着是 AATT组成核心序列及 3端 3个选择碱基, 对内含子区域和启动子区域进行选择扩增 (Li & Quiros, 2001; 李慧芝等, 2007)。近年来, SRAP技术在白菜、葱、番茄、黄瓜、西瓜、甜瓜、南瓜等重要蔬菜作物上开始应用 (Ferriol et al, 2003, 2004; 李严和张春庆, 2005; 韩建明等, 2007; 李慧芝等, 2007; 王燕等, 2007), 但在观赏植物上的应用尚未见报道。作者将 SRAP技术运用于矮牵牛遗传亲缘关系的分析当中, 为构建指纹图谱, 推动育种与新品种保护提供分子生物学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及其基因组 DNA 的提取

试验于 2007—2008年在中国农业大学观赏园艺与园林系实验室进行, 试材为 58个我国常见矮牵牛栽培品种 (表 1)。采用改良 CTAB法提取叶片 DNA, 在琼脂糖胶上检测 DNA 浓度和完整性。

表 1 58个供试品种名称及来源

Table 1 Name and resource of 58 cultivars

编号 No	品种 Cultivar	来源* Resource*	编号 No	品种 Cultivar	来源* Resource*
1	梦幻酒红花边 Dreams Raki Red Lace	a	30	爱琴海红色 Prism Red	d
2	梦幻鲑红色 Dreams Trout Reda	a	31	呼啦蓝色脉纹 Hurrah B blue Stripe	d
3	梦幻红色 Dreams Red	a	32	呼啦粉红色 Hurrah Pink	d
4	梦幻玫瑰花边 Dreams Rose Red Lace	a	33	呼啦玫红色 Hurrah Rose Red	d
5	梦幻玫红色 Dreams Rose Red	a	34	呼啦粉色脉纹 Hurrah Pink Stripe	d
6	梦幻粉色 Dreams Pink	a	35	阿拉丁红色 Aladdin Red	f
7	黄金时代蓝色 Primetime Blue	b	36	阿拉丁酒红色 Aladdin Raki Red	f
8	黄金时代红色 Primetime Red	b	37	阿拉丁玫红色 Aladdin Rose Red	f
9	黄金时代猩红色 Primetime Scarlet	b	38	霜系列天鹅绒色 Frost Velvet	f
10	黄金时代白色 Primetime White	b	39	霜系列火红色 Frost Flaming	f
11	黄金时代粉红色 Primetime Pink	b	40	霜系列樱桃红色 Frost Cherry Red	f
12	黄金时代玫红色 Primetime Rose Red	b	41	喝彩粉色 Bravo Pink	e
13	超越蓝星 Ultra Blue Lace	b	42	喝彩白色 Bravo White	e
14	超越红色 Ultra Red	b	43	喝彩蓝色 Bravo Blue	e
15	超越粉色 Ultra Pink	b	44	丰花紫色 Feng Hua Purple	g
16	海市蜃楼春天 Mirage Spring	a	45	丰花白色 Feng Hua White	g
17	海市蜃楼夏天 Mirage Summer	a	46	丰花玫红色 Feng Hua Rose Red	g
18	海市蜃楼紫色 Mirage Purple	a	47	梅林红色 Merlin Red	h
19	海市蜃楼蓝星 Mirage Blue Lace	a	48	梅林粉色 Merlin Pink	h
20	海市蜃楼酒红星 Mirage Rakired Lace	a	49	梅林樱桃红色 Merlin Cherry Red	h
21	交响乐玫红色 Symphonyrose Red	c	50	霜系列蓝色 Frost Blue	b
22	交响乐红白边 Symphonyred Lace	c	51	霜系列玫红圈 Frost Rose Ring	b
23	交响乐红色 Symphony Red	c	52	双瀑布玫红色 Double Cascade Rose Red	a
24	交响乐玫红白边 Symphonyrose Red Lace	c	53	双瀑布红色 Double Cascade Red	a
25	交响乐蓝色 Symphony Blue	c	54	超级瀑布红色 Super Cascade Red	a
26	爱琴海玫红色 Prism Rose Red	d	55	超级瀑布蓝色 Super Cascade Blue	a
27	爱琴海白色 Prism White	d	56	京冠玫红色 Jing Guan Rose Red	i
28	爱琴海黄色 Prism Yellow	d	57	京冠紫色 Jing Guan Purple	i
29	爱琴海蓝色 Prism Blue	d	58	京冠大红色 Jing Guan Red	i

*: a 美国泛美种子; b 美国金匠种子; c 日本陇井公司; d 英国弗洛拉诺瓦花卉种子; e 瑞士先正达种子; f 美国伯爵种子; g 赤峰金太阳园艺; h 日本阪田种子; i 北京市园林科学研究所花卉研究中心。

*: a Pan American; b Goldsmith; c Takii; d Floranova; e Syngenta; f Bodger; g Chifeng Gold Horticulture; h Sakata; i Beijing Institute of Horticulture and Gardening

1.2 SRAP-PCR扩增与引物筛选

SRAP引物参考 Ferriol等 (2003) 与 Budak等 (2004) 的引物, 由 8条上游引物 (ME) 和 11条下游引物 (EM) 组合形成 88对引物。从供试品种中挑选出 5个形态和花色相差较大品种的 DNA 样品, 依次用 88对引物进行特异性扩增, 筛选能扩增出较多特异性条带的引物组合作为大群体扩增的引物。

1.3 PCR扩增及产物检测

PCR扩增反应在 BDMETRA Tgradient PCR 仪 (德国) 上进行。反应体系参照 Ferriol等 (2003) 的方法并进行优化。20 μL 扩增体系为: 双蒸水 10.7 μL , Buffer 3 μL , dNTPs 2 μL ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 上下游引物各 1 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 模板 DNA 2 μL ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), *rTaq*酶 0.3 μL ($0.075 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。扩增程序参照李慧芝等 (2007) 的方法。扩增产物进行垂直板变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (6%)。

1.4 数据分析计算

每个引物组合的多态性比率 (%) = 引物组合扩增的多态性条带数 / 总条带数 $\times 100$ 。每个引物的鉴别能力 (%) = 可鉴别的品种数 / 总品种数 $\times 100$ 。

采用 Jaccard's 相似系数, 使用 NTSYS-*pc* 2.0 软件, 非加权组平均法 (UPGMA) 聚类。相似系数计算公式为: $S_{ij} = a / (a + b + c)$, 其中 a 表示两份样品共有带数, b 表示 i 样品特有的条带数, c 表示 j 样品特有的条带数。

2 结果与分析

2.1 SRAP多态性分析

在 88对引物组合中, 有 20对可以扩增出较多特异性条带。图 1为 ME-7/EM-9的扩增图谱。

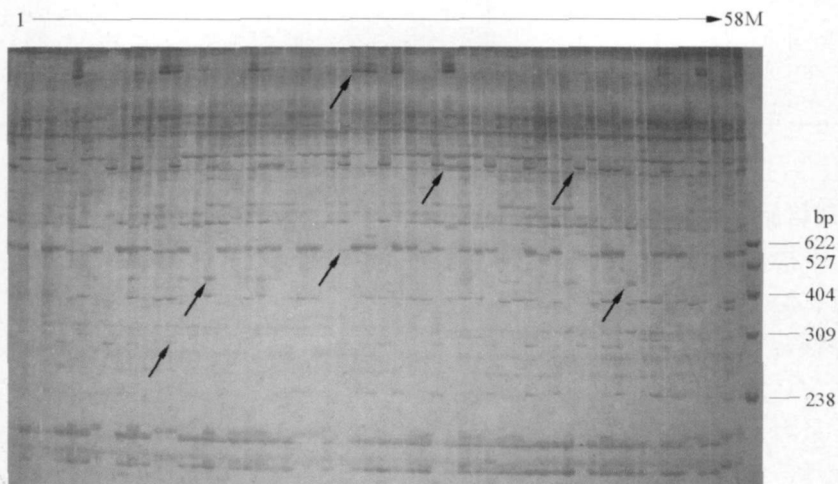


图 1 引物 ME-7/EM-9对 58个矮牵牛品种的扩增结果 (部分)

M. pBR322 marker; 1~58号品种见表 1。箭头表示多态性条带。

Fig. 1 The amplification result of 58 petunia hybrids by the primer pair ME-7/EM-9

M. DNA marker (pBR322); Cultivar number are the same as Table 1.

Arrows show polymorphic bands

用此 20对引物对 58个品种 DNA 进行 SRAP扩增, 结果 (表 2) 表明, 每个组合可以扩增出 13 ~ 40条清晰的条带, 20个引物组合共产生 527条多态性条带, 其中 389条为多态性条带, 多态性比率为 73.8%, 每个组合的多态性条带数为 10 ~ 32不等, 平均每个引物组合产生 19.5个多态性条带, 单个引物组合的多态性比率在 60.0% ~ 88.9%之间。

表 2 20对引物产生的多态性

Table 2 The number of polymorphic bands generated by 20 primer pairs

组合编号 Primer pair serial number	组合名称 Name of primer pair	总条带数 Total number	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 / % Polymorphic rate	可鉴别品种数 Number of distinguishable kind	鉴别能力 / % Distinguished ability
1	ME-1 / EM-1	13	10	76.9	14	24.1
2	ME-1 / EM-2	24	19	79.2	39	67.2
3	ME-1 / EM-4	21	15	71.4	47	81.0
8	ME-1 / EM-8	33	26	78.8	57	98.3
9	ME-1 / EM-9	16	11	68.8	41	70.7
11	ME-1 / EM-11	19	13	68.4	47	81.0
12	ME-2 / EM-1	29	22	75.9	41	70.7
14	ME-2 / EM-3	21	14	66.7	33	56.9
16	ME-2 / EM-5	25	15	60.0	31	53.4
27	ME-3 / EM-5	35	25	71.4	53	91.4
36	ME-4 / EM-3	19	14	73.7	47	81.0
37	ME-4 / EM-4	23	15	65.2	36	62.0
59	ME-6 / EM-4	38	30	78.9	50	86.2
60	ME-6 / EM-5	36	32	88.9	51	87.9
65	ME-6 / EM-10	25	22	88.0	54	93.1
66	ME-6 / EM-11	23	20	87.0	47	81.0
68	ME-7 / EM-2	24	17	70.8	38	65.5
71	ME-7 / EM-5	24	15	62.5	31	53.4
75	ME-7 / EM-9	39	26	66.7	58	100
77	ME-7 / EM-11	40	28	70.0	54	93.1

2.2 矮牵常见栽培品种的聚类分析

根据 SRAP引物扩增的 527条多态性条带, 对 58个矮牵牛常见栽培品种进行遗传多样性分析, Jaccard's相似系数在 0.55 ~ 0.87之间。呼啦蓝色脉纹和黄金时代猩红色的亲缘关系最远, 而海市蜃楼紫色和海市蜃楼蓝星最近。我国自育品种京冠大红色和京冠玫红色的相似性系数为 0.78。

在相似系数为 0.67的水平上, 可以将试材分为 4大类群 (图 2)。

第 1个类群最大, 从梦幻酒红花边到霜系列蓝色这 45个品种属于这一类群; 爱琴海黄色与其他品种亲缘关系较远, 单独聚为第 2类群, 第 3类群包括从黄金时代蓝色到海市蜃楼蓝星 5个品种; 其余 8个品种聚为第 4大类。

从聚类结果来看, 全部红色系列——大红色、酒红、粉红色、玫红色, 以及白色系列的部分品种和一个蓝色品种聚在第 1类群, 爱琴海黄色是所有供试品种中惟一的也是市场上少有的黄色花品种, 单独聚为一类, 绝大多数蓝色系列品种和少量白色系列品种聚为第 3类和第 4类。

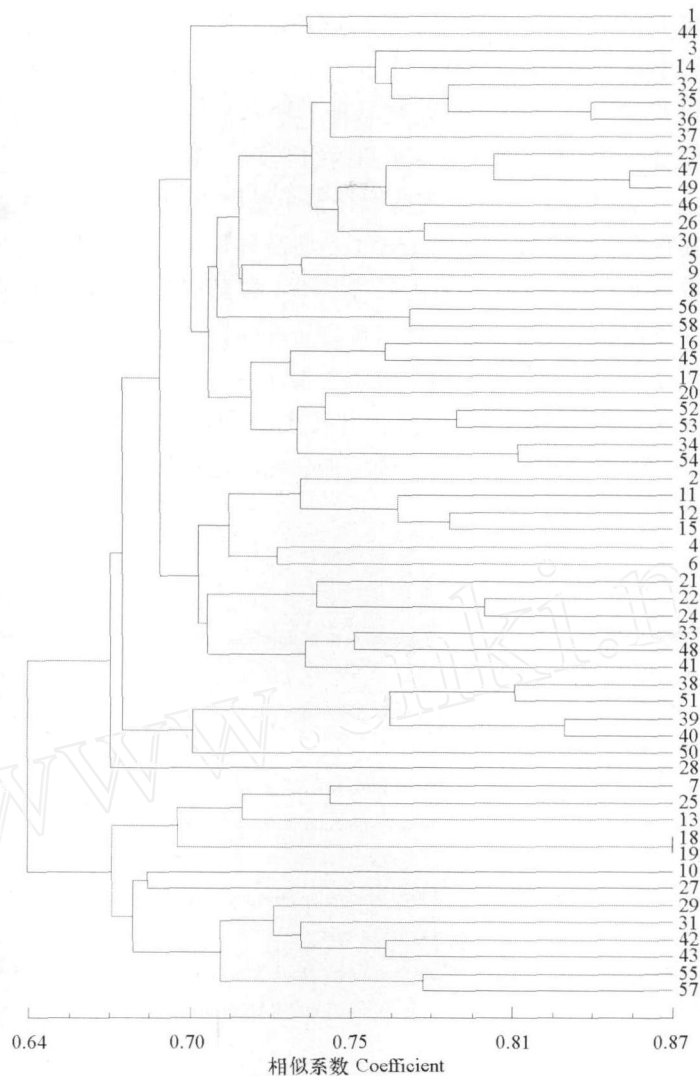


图 2 58个矮牵牛栽培品种的聚类分析图

Fig. 2 The dendrogram of phylogenetic relationship of 58 cultivars of *Petunia hybrida*

3 讨论

SRAP指纹图谱不仅多态性高、重复性好、操作简单、在基因组中分布均匀、引物具有通用性,而且其正向引物可以与反向引物两两搭配组合,因此用少量的引物可组配得到多个引物对,提高了引物的使用效率,降低合成引物成本。因而利用 SRAP构建品种指纹图谱是一种经济实用的方法。

Cemy等(1996)对矮牵牛5个种和10个栽培品种的研究表明,各供试材料在聚类分析图中的位置与花朵颜色高度相关,而不与品种系列相关。本研究也得出了类似的结果,显示出58个矮牵牛品种的聚类与花色密切相关,聚类图中第1类群为暖色系品种,第3、4类群为冷色系,黄花矮牵牛品种奇少且在相似系数很小时就单独聚为一类,而白色花品种分布于各个类群中。由此推测矮牵牛杂交育种过程中的亲本选择是以颜色为主导,而白色花聚类较分散可能另有其他原因。聚类结果中,我国自育品种丰花紫色聚类于暖色类群,与其他紫色花品种的位置不同,这可能是各国育种者对

花色的表述误差所致。本研究采用英国皇家园艺学会的比色卡 (RHS) 测量花色后得知, 丰花紫色品种的花色近似于阿拉丁酒红色品种的花色, 所以丰花紫色品种聚类在暖色部分是合理的。

另外, 在聚类结果中有的品种所在位置与同品种系列的其他品种距离较远, 如呼啦系列、超越系列、梦幻系列的品种以及我国自育的丰花系列品种。矮牵牛的花色是一个非常复杂的性状, Comu (1984) 发现, 控制花色的基因位点随机分布于基因组当中, 在已确定的 100 个基因中与花色合成有关的就多达 32 个。这进一步说明控制花色的基因在整个基因组中的地位很重要, 花色基因数量上的优势可能会影响控制其它性状的基因, 从而干扰了一些品种在聚类结果中的位置。

从本聚类结果来看, 国外同一公司培育的品种基本上聚到一起, 说明各育种公司拥有各自的核心种质, 这些核心种质资源相对交流也较少。我国自育品种的聚类结果也有类似的现象, 京冠系列的两个暖色品种亲缘关系较近。另外, 目前我国尚未建立矮牵牛的核心种质, 对优良亲本资源的遗传背景资料掌握甚少。本研究在 58 个矮牵牛上获得的 SRAP 标记资料有助于弄清矮牵牛品种的亲缘关系, 也可用于绘制矮牵牛指纹图谱, 对于准确鉴定矮牵牛品种, 选配杂交亲本组合, 有效保护新品种知识产权等方面具有重要意义。

References

- Budak H, Sheaman R C, Pamaksiz I 2004. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 328 - 334.
- Cemy T A, Caetano-Anollé G, Trigiano R N, Staman T W. 1996. Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of *Petunia taxa*. *Theor Appl Genet*, 92: 1009 - 1016.
- Comu A. 1984. Monographs on theoretical and applied genetics. Sink K C. *Petunia*. New York: Springer Verlag: 34 - 37.
- Ferriol M, Pico B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, (107): 271 - 282.
- Ferriol M, Pico B, Pascual Fernandez de Cordova, Nuez F. 2004. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker. *Crop Science*, 44: 653 - 664.
- Han Jian-ming, Hou Xi-lin, Xu Hai-ming, Shi Gong-jun, Geng Jian-feng, Deng Xiao-hui 2007. Genetic differentiation of non-heading Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* ssp. *chinensis* Makino) germplasm based on SRAP markers. *Acta Agronomica Sinica*, 33 (11): 1862 - 1868. (in Chinese)
- 韩建明, 侯喜林, 徐海明, 史公军, 耿建峰, 邓晓辉. 2007. 不结球白菜 (*B. rassaica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 种质资源 SRAP 遗传分化分析. *作物学报*, 33 (11): 1862 - 1868.
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *B. rassaica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 455 - 461.
- Li Hui-zhi, Yin Yan-ping, Zhang Chun-qing, Zhang Min, Li Jian-min 2007. Evaluation of application of SRAP on analysis of genetic diversity in cultivars of *Allium fistulosum* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 929 - 934. (in Chinese)
- 李慧芝, 尹燕萍, 张春庆, 张敏, 李建敏. 2007. SRAP 在葱蒜栽培品种遗传多样性研究中的适用性分析. *园艺学报*, 34 (4): 929 - 934.
- Li Yan, Zhang Chun-qing 2005. Studies on genetic diversity with a molecular marker SRAP of watermelon hybrids. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 643 - 647. (in Chinese)
- 李严, 张春庆. 2005. 西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析. *园艺学报*, 32 (4): 643 - 647.
- Wang Yan, Gong Yi-qin, Zhao Tong-min, Liu Guang, Yu Fan-min, Ye Hai-long, Liu Li-wang 2007. Optimization of SRAP-PCR system and cultivar molecular identification in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 30 (1): 23 - 29. (in Chinese)
- 王燕, 龚义勤, 赵统敏, 刘广, 郁樊敏, 叶海龙, 柳李旺. 2007. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定. *南京农业大学学报*, 30 (1): 23 - 29.