

# 月季种质鉴定和多样性分析

郭立海<sup>1,2</sup> 金德敏<sup>1</sup> 王斌<sup>1</sup> 刘敏<sup>1</sup> 巢阳<sup>3</sup> 勇玮<sup>3</sup> 陈毓荃<sup>2</sup> 翁曼丽<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院遗传研究所, 北京 100101; <sup>2</sup> 西北农林科技大学, 杨凌 712100; <sup>3</sup> 北京市园林研究所, 北京 100102)

**摘要:** 利用 RAPD 技术对 28 个月季品种和 2 个蔷薇品种进行了遗传多样性分析, 从 145 个引物中筛选出 12 个引物, 可以扩增出清晰、稳定和多样性高的产物。其中 3 个引物从 30 个材料中扩增出 3 个品种特异的 RAPD 分子标记, 并将其中的一个成功地转换成了 SCAR 标记。利用筛选出的 12 个引物扩增出的 65 条多态性片段作了聚类分析, 对这些月季品种的亲缘关系和进化作了初步探讨。

**关键词:** 月季; 种质鉴定; RAPD 标记; SCAR 标记; 聚类分析

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 06-0551-05

月季 (*Rosa chinensis* Jacq) 是蔷薇科蔷薇属的一个重要类群, 种类繁多, 来源广泛, 加上频繁的种内杂交, 其种质资源复杂多样, 使分类和鉴定工作难度加大。以往的形态学和生理生化指标鉴定分类受环境因素和发育阶段的影响, 很难满足月季分类鉴定、产权保护和选育工作的需要。国外有人证明 RAPD 技术可以应用于月季种质鉴定和多样性分析<sup>[1~3]</sup>, 在我国此类工作刚刚开展。本研究的目的是通过 RAPD 分析来寻找北京市主要月季品种的特异分子标记, 进而将其转换成稳定的 SCAR 标记, 并对部分月季品种进行遗传多样性和亲缘关系的初步探讨, 以期用于月季的分类鉴定和选育工作。

## 1 材料与方法

考虑到现代月季有一些是通过和蔷薇杂交得到的, 故本试验材料中除了月季外还用了两种蔷薇。供试材料共 30 个, 包括了月季的 7 个类群和 1 种所属类群不明确的月季材料 (表 1)。

**模板 DNA 的制备和 RAPD 扩增反应:** 春季从北京市园林研究所取健康正常幼叶放于冰壶带回实验室, 液氮研磨, 进行 DNA 的提取, 纯化, 并在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳中进行模板 DNA 定量<sup>[4]</sup>。RAPD 反应在 MJ PTC-100 型扩增仪上完成, 所用引物为美国 Operon 公司产品。扩增反应体系为: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 每种 dNTPs 0.1 mmol/L, 2.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 15 ng 引物, 20 ng 模板, 1U Taq DNA 聚合酶, 反应体积为 25  $\mu$ L。扩增反应程序为 94 预变性 4 min, 然后按程序: 94 45 s, 37 1 min, 72 1.5 min 扩增 42 个循环, 最后在 72 延伸 5 min, 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 经 EB 染色后在紫外灯下观察照相。

**聚类分析:** 首先将扩增的 RAPD 片段的多态性信息转化成计算机语言, 即在某一分子大小处出现电泳带记为 1, 不出现记为 0, 利用平均连锁聚类方式 (UPGMA) 软件进行聚类作图<sup>[5]</sup>。

**RAPD 特异扩增产物的回收, 克隆和测序:** 在紫外灯下从琼脂糖凝胶上将目标带切下, 用 glassmilk 法分离纯化, 按照生产厂家提供的程序克隆到 PGEM -T easy Vector 系统 (Promega Corporation, Cat. No. A1360), 然后转入 E. coli XL1-blue 菌株中, 提取质粒, 酶切确认为正确克隆, 然后送博亚公司 (上海) 测序。

**SCAR 引物的设计及 SCAR - PCR 反应:** 参考 RAPD 特异产物两个 5' 端的碱基序列, 按 Paran 的方法<sup>[6]</sup>设计一对 20~22 bp 的 SCAR - PCR 引物, 每对引物都包含对应的 RAPD 引物的 10 个碱基序列, 引物的合成由博亚公司完成。在 Perkin Elmer Cetus 480 型 DNA 扩增仪上先按常规反应条件进行扩增,

收稿日期: 2001 - 10 - 22; 修回日期: 2002 - 03 - 15

\*通讯作者。 \*Corresponding author.

并按照 Stratagene PCR 优化试剂盒的实验指导对反应条件和程序进行筛选比较, 直至获得理想的条件<sup>[7]</sup>。扩增产物在 1.0 % 的琼脂糖凝胶中电泳, 经 EB 染色后在紫外灯下观察照相。

表 1 供试材料编号、类群和主要性状

Table 1 List of samples used for RAPD analysis

序号 No.	名称 Name	类群 Section	主要性状 Major characters	序号 No.	名称 Name	类群 Section	主要性状 Major characters
1	金 门 Golden Gate	HT	金黄色, 重瓣 Golden yellow, multiplicate	15	藤墨红 Lillair rreell	CL	深红色, 重瓣 Deep red, multiplicate
2	红双喜 Double Delight	HT	红边黄心, 重瓣 Red margin multiplicate flower with yellow in middle	16	新 月 New Dawn	CL	浅粉色, 半重瓣 Light pink, semidouble
3	火和平 Kronenbourg	HT	正红背金, 重瓣 Red multiplicate flower with antitropic gold	17	坎特公主 Princess Michael of Kent	G	金黄色 Golden yellow
4	漂多斯 Peaudouce	HT	淡黄色, 重瓣 Light yellow, multiplicate	18	粉后 Queen Elizabeth	G	粉红色 Pink
5	绿 云 L Yun	HT	白微带绿色, 重瓣 White with little green, multiplicate	19	白佳人 Bajazzo	G	白色, 重瓣 White, multiplicate
6	梅郎随想曲 Caprice de Meilland	HT	正红背白, 半重瓣 Red semidouble flower with antitropic white	20	肯特 Kent	G	白色, 半重瓣 White, semidouble
7	金玛利 Golden Marie	F	黄色, 半重瓣 Yellow, semidouble	21	哈德富郡 Hertfordshire	G	粉色, 单瓣 Pink, haplopetalous
8	金色赫尔斯坦 Golden Holstern	F	黄色, 半重瓣 Yellow, semidouble	22	巴西诺 Bassino	G	红色黄心, 单瓣 Red haplopetalous flower with yellow in middle
9	仙 境 Paradise	F	浅粉色, 重瓣 Light pink, multiplicate	23	胡佛总统 Present Herber Hoover	HT	红色, 半重瓣 Red, semidouble
10	曼海姆 Schloss Man Heim	F	红色, 半重瓣 Red, semidouble	24	为何不 Why not	Min	先黄再红后粉, 重瓣 Yellow then red and then pink multiplicate flower
11	金秀娃 Golden Showers	CL	黄色, 半重瓣 Yellow, semidouble	25	小女孩 Little Girl	Min	深红色, 半重瓣 Deep red, semidouble
12	至高无上 Altissimo	CL	红色, 单瓣 Red, haplopetalous	26	尖刺蔷薇 Sptinter rose	蔷薇 Rosa L.	白色, 单瓣 White, haplopetalous
13	怜 悯 Compassion	CL	粉色黄心, 半重瓣 Pink semidouble flower with yellow in middle	27	疏花蔷薇 Sparse flower rose	蔷薇 Rosa L.	白色, 单瓣 White, haplopetalous
14	橘红色火焰 Darthuizer Orange Fire	CL	橘红色, 半重瓣 Tangerine, semidouble	28	白花十姐妹 White ten sisters	Pbl	白色, 重瓣 White, multiplicate
				29	粉花十姐妹 Pink ten sisters	Pbl	粉色, 重瓣 Pink, multiplicate
				30	香 紫 绒 Fragrant purple flamel	不详 Unknown	粉红色, 重瓣 Pink, multiplicate

注: F: 丰花月季; G: 大花月季; Min: 微型月季; HT: 杂种茶香月季; CL: 藤本月季; G: 地被月季; Pbl: 小花矮灌月季。

Note: F: Floribunds roses; G: Grandiflora roses; Min: Miniature roses; HT: Hybrid tea roses; CL: Climbing roses; G: Ground roses; Pbl: Polyantha roses.

## 2 结果与分析

### 2.1 月季特异 RAPD 标记和多态性片段的获得

从 30 个供试材料中先随机选出 12 个材料进行引物筛选, 从 145 个引物中初筛出 40 个能产生较清晰多态性片段的引物, 然后利用这 40 个引物来扩增供试的 30 个材料, 每个引物重复扩增 3 次。从中选出 12 个引物, 能在 30 个材料中扩增出清晰的重复性好的多态性片段。从 RAPD 扩增情况来看, 每个引物扩增出的 RAPD 谱带一般有 2~11 条, 每条带的分子量在 0.3~4.0 kb。经过重复试验, 获得了 3 个月季品种 (9 号仙境、10 号曼海姆和 21 号哈德富郡) 的特异分子标记, 它们的特异标记分别为 OPR-16<sub>877</sub>、OPQ-17<sub>520</sub> 和 OPT-09<sub>1600</sub>, 其 RAPD 扩增图谱如图 1 所示。从图 1 可以看出每个特异扩增产物只在一个材料中出现, 具有品种特异性。月季品种间的多态性很高, 12 个引物共扩增出 65 条

带，只有 2 条带是 30 个材料共有的，其它 63 个条带在材料间或多或少都有差异。

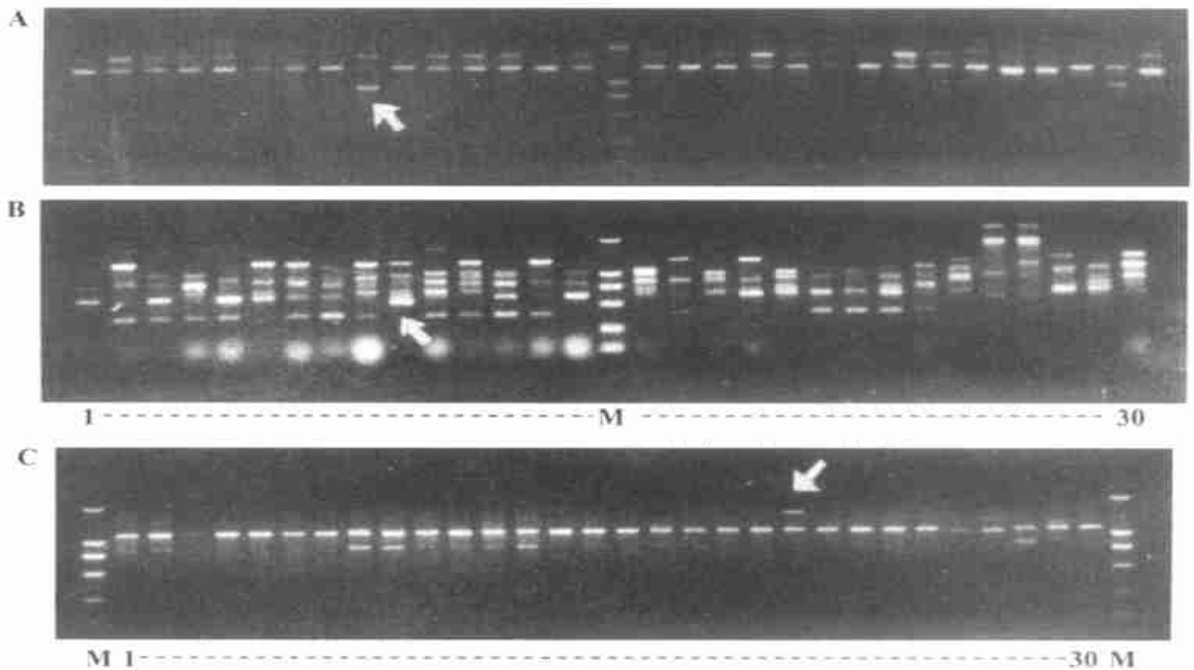


图1 月季 RAPD 特异分子标记的获得

A、B、C 分别示特异 RAPD 标记 OPR-16<sub>877</sub>、OPQ-17<sub>520</sub>和 OPT-09<sub>1600</sub>，图中 1~30 泳道对应于表 1 中相同编号的材料，M 为 DNA 分子量标准 DL2000 (TaKaRa Biotech. Co. Ltd)，箭头示特异条带。

Fig. 1 Specific RAPD markers of rose

A, B and C represent specific RAPD markers OPR-16<sub>877</sub>, OPQ-17<sub>520</sub> and OPT-09<sub>1600</sub> respectively.

M represents DNA marker DL2000 (TaKaRa Biotech. Co. Ltd); arrows indicate the specific fragment; Numbers of materials are inferred to table 1.

## 2.2 RAPD 产物的测序及 SCAR 引物设计

共获得 3 个 RAPD 特异片段，仅对其中两个单拷贝片段 (OPR-16<sub>877</sub>和 OPT-09<sub>1600</sub>) 进行了测序。根据其序列，设计了 SCAR-PCR 引物的序列如下：

OPR-16<sub>877</sub>的SCAR-PCR引物1: 5'CTCTGCGCGTGGCAATTATTTG3'

引物2: 5'CTCTGCGCGTATATATTATG3'

OPT-09<sub>1600</sub>的SCAR-PCR引物1: 5'CACCCCTGAGCTACTATGTATG3'

引物2: 5'CACCCCTGAGATAGACGAGG3'

## 2.3 SCAR 标记的转换

利用前述的 RAPD 反应体系，设置不同的反应条件摸索理想的 SCAR-PCR 反应程序，其中 OPR-16<sub>877</sub> RAPD 标记已被成功地转换成了 SCAR 标记 (见图 2)。其 SCAR-PCR 反应体系为：10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)，50 mmol/L KCl，2.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，每种 dNTPs 各为 0.1 mmol/L，15 ng 引物，20 ng 模板 DNA，1U Taq DNA 聚合酶，反应体积为 25 μL；反应程序为：94 预变性 4 min，然后按程序：94 1 min，60 1 min，72 1.5 min 扩增 30 个循环，最后在 72 延伸 5 min。而 OPT-09<sub>1600</sub>没能转换成 SCAR 标记，在设置的各种反应条件和反应程序下，除了 21 号哈德富郡正常扩增出 1 600 bp 片段外，其它一些材料也能扩增出此片段。

我们将 OPR-16<sub>877</sub>的序列在 GenBank 上做 Blast 分析，进行同源性比较，未发现与 GenBank 中已有序列有较高同源性。

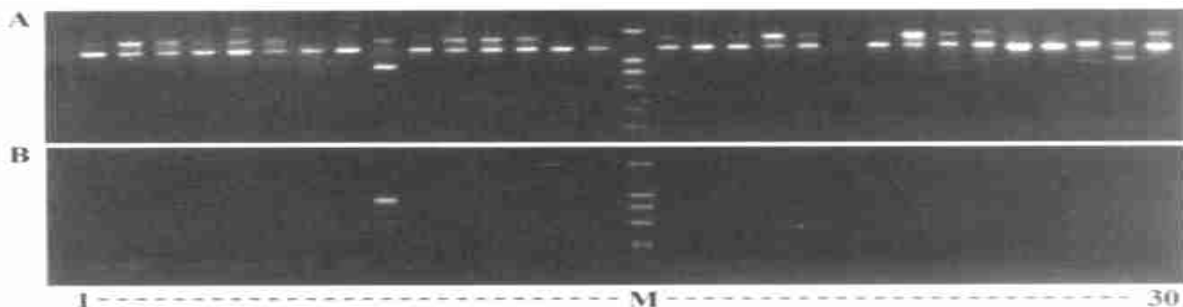


图2 ‘仙境’ SCAR 标记的获得

A、B 分别为特异标记 OPR-16<sub>877</sub> 的 RAPD 扩增图谱和相应 SCAR 扩增图谱。图中 1~30 泳道对应于表 1 中相同编号的材料，M 为 DNA 分子量标准 DL2000 (TaKaRa Biotech. Co. Ltd)。

Fig. 2 SCAR marker of rose ‘Paradise’

A and B show the specific RAPD marker OPR-16<sub>877</sub> and specific SCAR marker respectively. M represents DNA marker DL2000 (TaKaRa Biotech. Co. Ltd). Numbers of materials are inferred to table 1.

## 2.4 聚类分析

根据筛选出的 12 个引物扩增出的 65 条谱带，利用平均连锁聚类方式 (UPGMA) 软件进行聚类分析，生成 30 个供试材料的亲缘关系树状图 (图 3)。当聚合线取在相似系数为 0.7 时，30 个供试材料被分为 6 大类，绝大多数材料的分类结果与传统分类结果一致，但有几个例外 (见讨论)。

## 3 讨论

月季品种繁多，彼此杂交频繁，命名没有规则，很多月季品种的谱系遗传背景不清楚，所以根据亲缘关系农艺性状进行分类存在一定困难。本研究根据 RAPD 分析结果对供试的 30 份材料进行了聚类，在相似系数为 0.7 时这 30 份材料被聚类为 6 个类群。从图 3 中可以看出，尖刺蔷薇和疏花蔷薇聚在一起而与其它材料区别开，表明这两个蔷薇与月季的亲缘关系比较远，可能是比较原始的蔷薇品种。而其余 28 个材料分成了

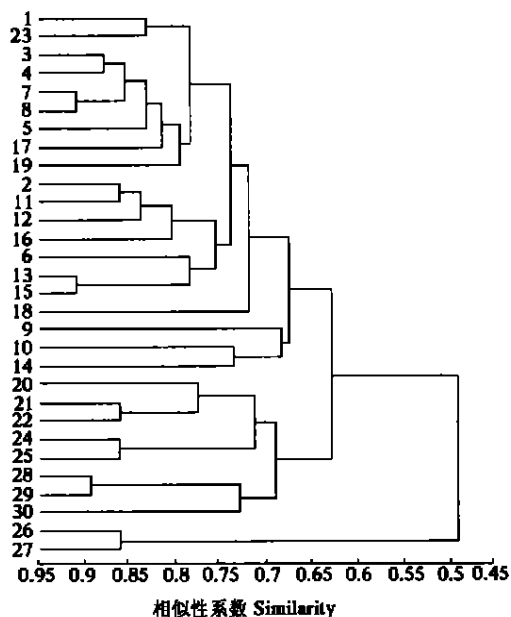


图3 根据 RAPD 分析绘制的 30 个供试材料的聚类图  
样品编号见表 1。

Fig. 3 Cluster analysis of 30 individuals based on RAPD data  
Numbers of materials are inferred to table 1.

两大组，第一组包括了供试的所有的杂种茶香月季，丰花月季，藤本月季和大花月季品种，这些月季品种没有完全归到各自所属的类群中，这一方面说明，这四个类群之间发生过相互杂交，导致一个品种可能包含了几个类群的遗传因子，类群之间的界限已经变得不清晰，发生了基因的渗透和交换；另一方面也证实了藤本月季的大部分是从杂种茶香和丰花等灌木月季芽变而来<sup>[8]</sup>，它们的基因组很大部分是相同的。但聚类结果仍能基本反映出各类群所含品种遗传背景的一致性，一个类群内的大部分品种还是聚在了一起，如 1 号金门、23 号胡佛总统、3 号火和平、4 号漂多斯和 5 号绿云 5 个杂种茶香月季，17 号坎特公主和 19 号白佳人 2 个大花月季，11 号金秀娃、12 号至高无上、16 号新月、13 号怜悯和 15 号藤墨红 5 个藤本月季，都分别聚在了一起，还有 7 号金玛利、8 号金色赫尔斯斯坦和 9 号仙境、10 号曼海姆 4 个丰花月季也分别聚在了一起，表明各类群的品种亲缘关系近，起源基本相同。第二组包括了供试的所有地被月季品种和微型月季品种，地被的 3 个品种 20 号肯特、21 号哈德富郡、

22 号巴西诺和微型的 24 号为何不、25 号小女孩聚在了一起，这可能是由于它们的性状（如花小，株型小）不显眼而没有引起育种家的重视，避免了种内杂交从而保持了其遗传背景的一致性，进化比较保守。28 号和 29 号，它们是十姐妹型月季，属于古代月季中的小花矮灌月季<sup>[8]</sup>，所以聚在了一起，30 号香紫绒和两个十姐妹型月季聚在了一起，说明它们的亲缘关系较近，从聚类图可以看出这 3 个月季与地被和微型月季的亲缘关系相对较近，而与杂种茶香、大花、丰花和藤本月季的亲缘关系相对较远。本实验的结果表明依据分子标记的聚类结果与传统方法的聚类结果基本一致，在实际应用时，用分子标记聚类得出的结果应与传统分类的结果结合起来分析，相互印证。对一些表现型相近而难以区分的材料而言，分子标记分析得出的结果会更有价值。

### 参考文献：

- 1 Torres A M, Millán T, Cubero J I. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience*, 1993, 28 (4): 333 ~ 334
- 2 Reyniers-alouisi S, Bollereau P. Characterization of genetic diversity in genus *Rosa* by randomly amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.*, 1996, 424: 253 ~ 259
- 3 Jan C H, Byrne D H, Manhart J, et al. Rose germplasm analysis with RAPD markers. *HortScience*, 1999, 34 (2): 341 ~ 345
- 4 Jia J H, Wang P, Jin D M, et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *Porphyra*. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42: 403 ~ 407
- 5 史尼斯 P 著，数值分类学。赵铁桥译。北京：科学出版社，1984. 208 页
- 6 Paran I, Mielchmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, 85: 985 ~ 993
- 7 王 斌，张超良，翁曼丽，等。玉米自交系 8112 特异 SCAR 标记的获得。高技术通讯，1999，9 (3): 45 ~ 47
- 8 余树勋。月季。北京：金盾出版社，1992. 106 页

## Variety Identification and Genetic Diversity Analysis of Rose with RAPD Molecular Markers

Guo Lihai<sup>1,2</sup>, Jin Demin<sup>1</sup>, Wang Bin<sup>1</sup>, Liu Min<sup>1</sup>, Chao Yang<sup>3</sup>, Yong Wei<sup>3</sup>, Chen Yuquan<sup>2</sup>, and Weng Manli<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> Institute of Genetics, CAS, Beijing 100101, China; <sup>2</sup> Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; <sup>3</sup> Beijing Landscape Gardening Research Institute, Beijing 100102, China)

**Abstract :** Variety identification and genetic diversity analysis of rose were studied using RAPD technique. A total of 30 individuals were analyzed, 3 specific RAPD markers were found from 65 RAPD bands amplified with 12 primers. One of them was converted to SCAR marker. Phylogenetic relationships of the 30 individuals was developed based on phylogenetic tree conducted with UPGMA method.

**Key words :** Rose ; Germplasm identification ; RAPD markers ; SCAR markers ; Cluster analysis

## 海峡两岸园艺发展学术研讨会在厦门召开

由福建省科协、中国园艺学会、中国农学会庭院经济分会、台湾大学园艺学系、福建省园艺学会、福建省农学会庭院经济分会共同主办，厦门市园艺学会协办的“海峡两岸园艺发展学术研讨会”于 2002 年 10 月 22 ~ 28 日在厦门市隆重召开。参加本次会议的园艺、园林和庭院经济学界的两岸学者共 80 余人，其中来自中国大陆的有中国工程院院士、中国园艺学会副理事长方智远研究员，中国工程院院士、山东农业大学园艺学院束怀瑞教授以及 8 所高等院校和科研单位 50 多位专家学者，来自中国台湾的有台湾大学园艺学系名誉教授康有德先生和凌德陵先生以及 5 所大学和科研单位的专家教授 26 人。会议共收到学术论文 72 篇。这次学术讨论会以园艺业发展为主题，多层面探讨了园艺业发展的热点问题（包括两岸园艺发展态势、两岸农业资源优势互补、加入 WTO 的应对措施等），促进了两岸学者的了解与合作。

中国园艺学会办公室  
2002 年 10 月 30 日