

万寿菊杂交一代遗传多态性的 SRAP 标记分析

张西西^{1,2}, 徐进¹, 王涛², 董爱香², 赵梁军^{1*}

(¹ 中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094; ² 北京市园林科学研究所, 北京 100102)

摘要: 应用 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 分子标记对当前市场上推广的 48 个万寿菊杂交一代品种进行遗传多态性研究, 用 60 个引物组合进行扩增, 从中筛选到 20 个多态性引物组合, 共产生 289 个多态性条带, 平均每个引物组合产生 14.45 个多态性条带, 显示了较高的多态性比率。聚类分析 20 个引物组合的扩增结果, 48 份材料分为两大类, Jaccard's 相似系数在 0.25~0.91 之间。

关键词: 万寿菊; 杂交种; 多态性; SRAP

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 08-1221-06

Genetic Diversity with Molecular Marker SRAP of *Tagetes erecta* L.

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

(¹ Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

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

Abstract: Study on genetic diversity of marigold could benefit the research of cultivar property right protecting, seanged purity testing, and genetic breeding. A new molecular marker system—SRAP (sequence-related amplified polymorphism) was firstly applied on 48 marigold hybrids genetic diversity research. Twenty primer pairs selected from 60 amplified 289 polymorphic bands with an average of 14.45 polymorphic bands perprimer pair. Cluster analysis using UPGMA method which based on the data of SRAP amplified bands by 20 primer pairs showed 48 hybrids could be distinguished into two main groups. Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.25 to 0.91.

Key words: *Tagetes erecta* L.; hybrid; polymorphism; SRAP

万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 是重要的花坛花卉, 在美国、印度、中国以及欧洲和非洲的大部分地区有广泛的栽培, 耐干旱和瘠薄, 适应性强。

近 20 年来, 研究者在万寿菊属种质资源收集、形态学和生物学特性、遗传关系以及新品种选育方面做了研究 (Verma et al., 2004; 李福荣 等, 2005; 赵景云 等, 2005; 李娜 等, 2006; 田海燕 等, 2007), 同时, 同工酶和分子标记辅助育种也广泛应用在万寿菊的新品种选育中 (沈一岚 等, 2006; 梁顺祥 等, 2007; 齐迎春 等, 2007)。

由于万寿菊杂交一代的遗传基础很狭窄, 造成品种间多态性较低。利用 AFLP 技术可以区分形态上差异较大的父、母本以及杂交一代 (李福荣, 2005), 但尚未见到利用分子标记技术区分杂交一代品种之间特别是同一系列不同颜色的万寿菊杂交一代品种的报道。

Li 和 Quiros (2001) 开发了一种新型分子标记 SRAP (sequence-related amplified polymorphism), 可通过独特的引物设计优先扩增基因组内的开放阅读框 (ORF), 对基因组内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。该标记具有简

收稿日期: 2008-03-13; 修回日期: 2008-06-11

基金项目: 北京市科委重大项目 (D0705003040121)

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

便、稳定,兼有 RAPD 的操作简单和 AFLP 重复性好、多态性强的优点,目前已应用于图谱构建、遗传多样性分析和品种鉴定中(李严和张春庆,2005;韩建明等,2007;李慧芝等,2007;李晓慧等,2007)。

作者将 SRAP 分子标记应用于万寿菊的遗传分析,旨在了解众多万寿菊品种的遗传背景,为万寿菊杂种优势利用中的亲本选配,花卉品种的鉴定和知识产权保护提供依据。

1 材料与方法

供试材料为当前生产上推广的万寿菊 48 个杂交一代品种(详见图 2),除 0120、0130、0140、0150、0170、0110 这 6 个品种是本课题组自育之外,其他品种的种子均购自国内外各花卉种子公司。全部采用 2006 年收获的种子,其株高、冠幅、叶形、花径、花色等形态特征和农艺性状各不相同,具有代表性。

试验于 2006—2007 年在中国农业大学农学与生物技术学院观赏园艺与园林系实验室进行。SRAP 引物参考 Ferriol 等(2004)的引物,从中选出 6 条正向引物和 10 条反向引物,正向引物和反向引物两两搭配组合,形成 60 个引物组合。正向引物(forward primer)有 ME-1、ME-2、ME-3、ME-5、ME-6、ME-8;反向引物(reverse primer)为 EM-1、EM-2、EM-3、EM-4、EM-5、EM-6、EM-8、EM-9、EM-10、EM-11。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, *Taq* 酶和反应底物均购自该公司。

DNA 提取参考 Li 和 Quiros(2001)的方法,提取具有 1 对真叶时期的幼苗叶片 DNA,并进行了检测。PCR 扩增反应体系和反应程序参考 Ferriol 等(2003,2004)的方法。PCR 反应在 PTC-100 温度循环仪(美国产)上进行。

扩增产物进行垂直板变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%)。变性程序为 95 ℃ 5 min;4 ℃ 保存。65 W 恒功率电泳 2.0~2.5 h 至溴酚蓝移到凝胶底部结束后进行 AgNO₃ 染色。凝胶银染在张军等(2000)的方法上进行了改进,10% 乙醇与 0.5% 冰乙酸混合水溶液固定 15~20 min;用去离子水漂洗 3 min;2 g·L⁻¹ AgNO₃ 水溶液银染 25~30 min;水洗后用显色液(15 g·L⁻¹ NaOH,0.5% 甲醛)显色,直至条带清晰为止;10 g·L⁻¹ Na₂CO₃ 漂洗 1 min;去离子水漂洗 1 min。银染后的凝胶利用复日凝胶成像仪拍摄保存。试验 3 次重复。

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×100。每个引物的鉴别能力(%)=此引物组合可鉴别的品种类别数/总品种数×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 引物的多态性分析

60 个引物组合用于扩增 48 个万寿菊杂交品种,有 20 个引物组合能产生多态性条带,其中多态性较高的引物组合有 ME-8/EM-3(图 1)、ME-1/EM-9、ME-1/EM-10、ME-3/EM-3、ME-5/EM-8 和 ME-6/EM-2 等,每个组合可产生 15~25 条清晰条带(表 1)。

20 个引物组合共产生 289 条多态性条带,每个组合的多态性条带数为 7~25,平均每个引物组合产生 14.45 个多态性条带,单个引物组合的多态性比率在 58%~100% 之间。这说明 SRAP 多态性较高,适于鉴别万寿菊等园艺作物品种。

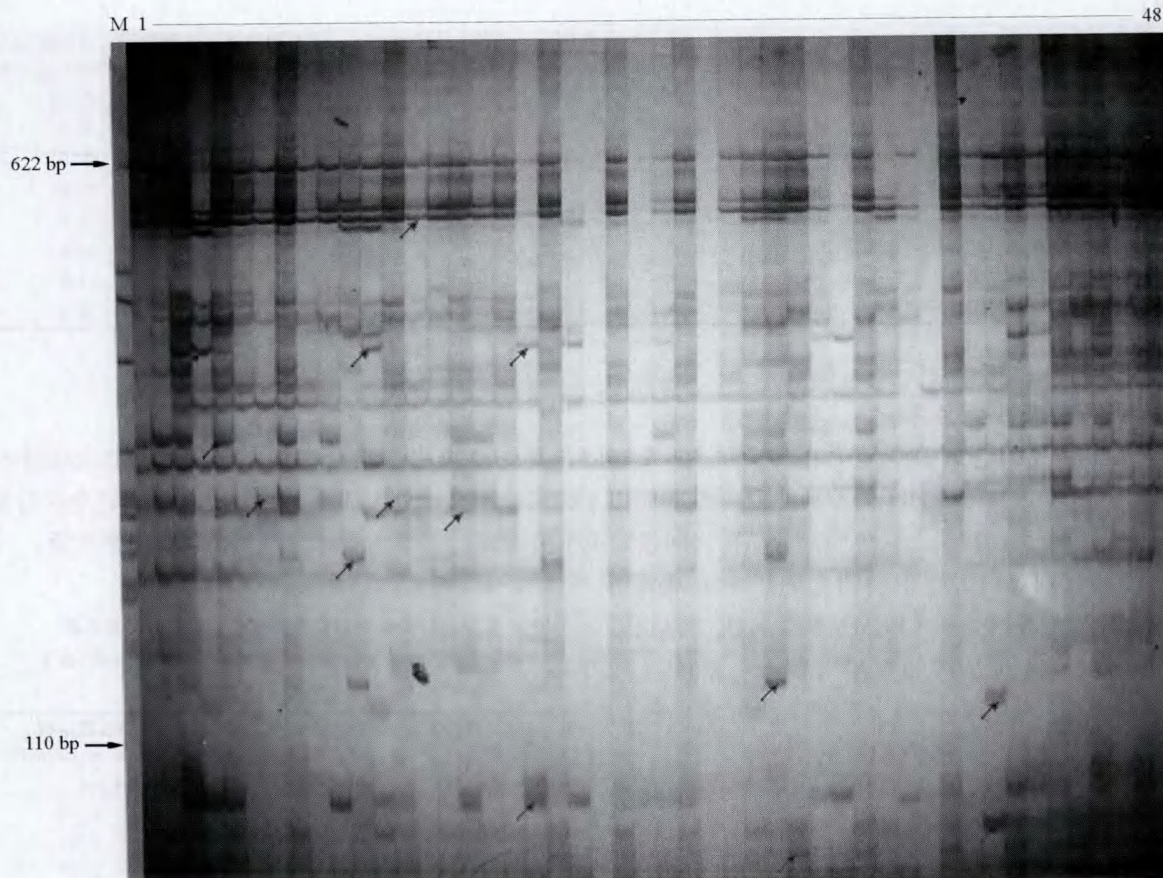


图 1 引物 ME-8/EM-3 对 48 个万寿菊杂交品种的扩增结果

M 为 DNA marker (pBR322); 1~48 号品种见图 2; 箭头表示多态性条带。

Fig. 1 The amplification result of 48 F_1 marigold cultivars by the primer pair ME-8/EM-3

M. DNA marker (pBR322); Cultivar number is the same as Fig. 2; Arrows show polymorphic bands.

表 1 20 个引物组合对 48 个万寿菊杂交品种的扩增结果

Table 1 The amplification result of 48 F_1 marigold cultivars 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	可鉴别的杂交品种数 Number of distinguishable kinds	鉴别能力/% Distinguished ability
4	ME-1/EM-4	13	12	92	5	10.0
6	ME-1/EM-6	23	22	96	12	25.0
8	ME-1/EM-9	25	25	100	18	38.0
9	ME-1/EM-10	21	21	100	39	81.0
16	ME-2/EM-6	13	9	69	40	83.0
20	ME-2/EM-11	13	13	100	4	8.3
22	ME-3/EM-2	11	7	64	3	6.3
23	ME-3/EM-3	19	17	89	7	15.0
24	ME-3/EM-4	12	7	58	25	52.0
25	ME-3/EM-5	12	8	67	7	15.0
27	ME-3/EM-8	18	16	89	20	42.0
32	ME-5/EM-2	14	13	93	20	42.0
34	ME-5/EM-4	15	14	93	26	54.0

续表 1

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	可鉴别的杂交品种数 Number of distinguishable kinds	鉴别能力/% Distinguished ability
36	ME-5/EM-6	7	7	100	3	6.3
37	ME-5/EM-8	20	20	100	43	90.0
42	ME-6/EM-2	20	20	100	19	40.0
51	ME-8/EM-1	18	18	100	14	29.0
53	ME-8/EM-3	21	20	95	42	88.0
58	ME-8/EM-9	8	8	100	11	23.0
60	ME-8/EM-11	14	14	100	8	17.0

2.2 品种多态性鉴定

20 个引物组合的鉴别能力在 6.3% ~ 90% 之间, 其中 4 个引物组合 ME-1/EM-10、ME-2/EM-6、ME-5/EM-8 和 ME-8/EM-3 的鉴别能力达到 80% 以上, 可以用来区分大部分品种。没有得到完全区分所有品种的单个引物组合。这说明部分品种之间亲缘关系极为接近, 多个品种共用一个亲本现象严重。

试验分别对每 2 组引物组合的扩增结果采用 Jaccard's 相似系数进行 UPGMA 聚类分析, 得到可以完全区分 48 个品种的 6 组引物组合搭配 (表 2), 选取其中的两对引物组合分别扩增比较结果, 就可以达到完全鉴别的目的。

从表 2 中可以看出, 5 个引物组合 (编号为 8、9、32、37、53) 可以用来搭配成为双引物组合用于鉴别, 选择引物组合进行搭配的原则主要依据各引物组合的鉴别能力, 一般鉴别能力越高, 搭配组合的鉴别能力越高, 品种间多态性越高。

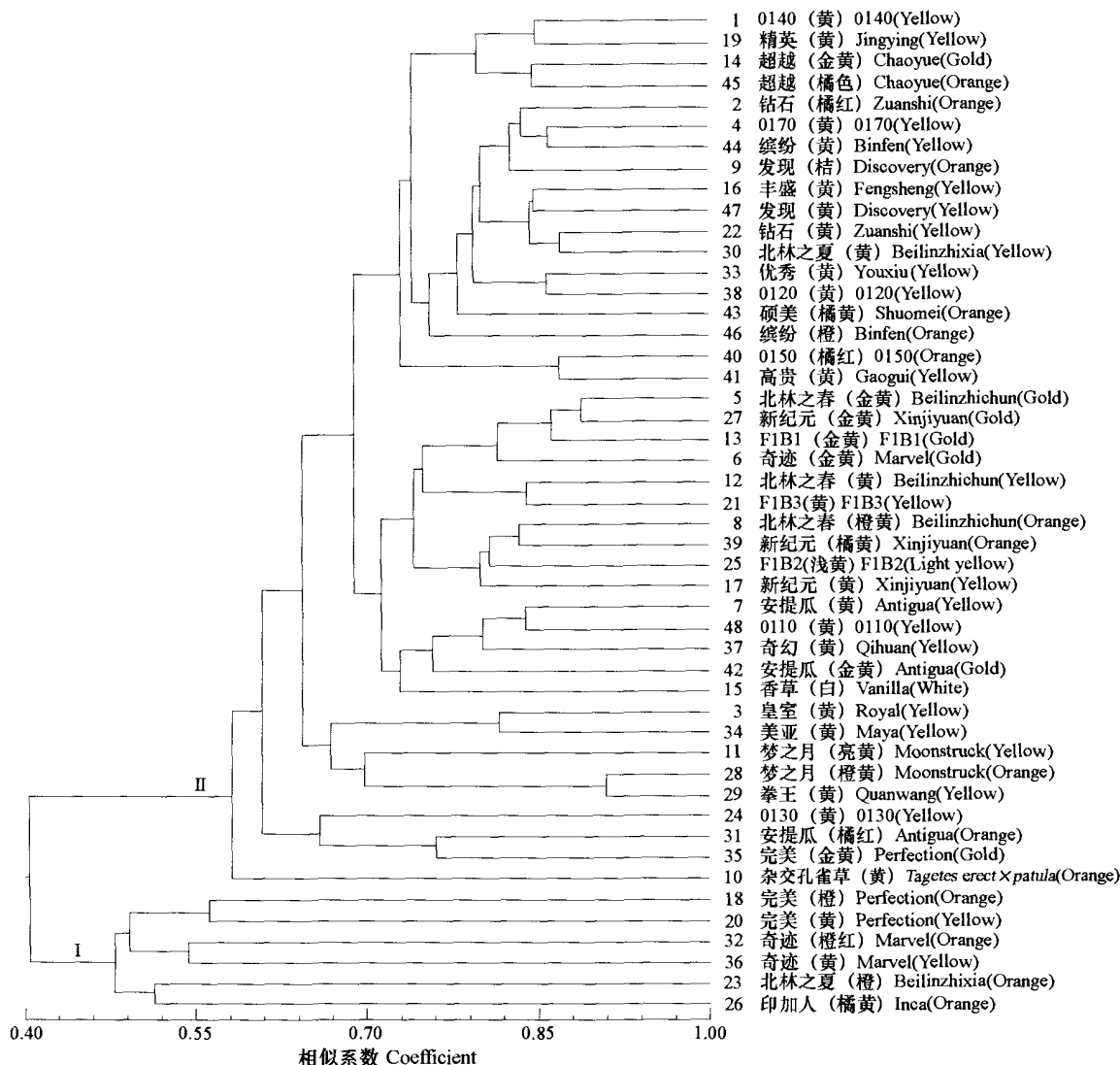
根据 20 对引物组合的扩增结果对 48 个杂交种进行聚类分析 (图 2), Jaccard's 相似系数在 0.25 ~ 0.91 之间。在相似系数为 0.48 的水平上, 可以将试材分为两大类, 18、20、32、36、23、26 为 I 类, 剩余品种聚为 II 类。作者所在课题组自育的 6 个品种 0120、0130、0140、0150、0170、0110 均可和其他几个品种区分开来, 说明这几个品种的遗传背景与其它品种不同。国内外培育的品种大多数都聚在第 II 类, 其中包括一个白色的万寿菊品种, 作者自育的 5 个品种全部集中在第 II 类, 说明各育种公司利用的育种材料相似或种质资源有交流; 而‘完美’、‘奇迹’和‘印加人’都是美国‘PanAmerican’和‘Goldsmith’公司培育的品种, 被聚为一类, 表明具有相近的遗传关系, 而国内培育的‘北林之夏’和美国‘Goldsmith’公司培育的品种也聚在 I 类 (图 2), 说明其亲本可能很相近, 同时不排除异名同物的可能。

在两大类中, 具有相同颜色的品种被聚为最相近的两类, 表明这几个品种可能具有相同的亲本来源。相同系列的品种聚在一起, 例如超越系列的金黄和橘色、完美的橙和黄、奇迹的橙红和黄, 安提瓜的黄和金黄, 说明他们的遗传关系较近。但安提瓜系列的橘红和金黄被分为不同类别, 2 个品种的形态差异也较大, 一个是黄色, 一个是橘红, 说明两者来自于不同的亲本。杂种孔雀草是以万寿菊为母本, 孔雀草为父本杂交得到的, 农艺性状上和其他万寿菊品种差异很大, SRAP 标记显示他们距离其他万寿菊品种较远, 说明 SRAP 标记分析的亲缘关系与形态特征观测结果一致。这也与齐迎春等 (2007) 的研究结果一致。SRAP 标记可为研究万寿菊的亲缘关系、品种演化与品种保护提供重要的信息。

表 2 鉴别 48 个杂交种的两对引物组合的搭配表

Table 2 Two primer pair combination to identify 48 F₁ marigold varieties

组合搭配(序号) Primer pair combination	总多态性条数 Total number of polymorphic bands	相似系数范围 Range of Jaccard's coefficient
8 + 9	46	0.28 ~ 0.98
8 + 37	45	0.38 ~ 0.93
9 + 32	34	0.34 ~ 0.97
9 + 37	41	0.34 ~ 0.98
9 + 53	41	0.36 ~ 0.98
37 + 53	40	0.37 ~ 0.95

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 48 F_1 marigold varieties

3 讨论

由于万寿菊遗传基础狭窄, 采用形态学鉴定容易混淆品种。SRAP 标记技术在万寿菊上的重复试验结果稳定, 能够区分绝大多数栽培品种。对于个别的遗传差异过小的品种虽不能用单个引物组合进行鉴别, 但可用两个引物组合来联合鉴别。SRAP 聚类分析技术在扩增产物检测时采用较复杂的聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染, 但与琼脂糖电泳检测结果相比其分辨率大大提高, 且不使用溴化乙锭, 环境污染与操作危险小, 可以为探讨万寿菊品种演化与亲缘关系提供有用信息。

本文讨论了部分 SRAP 引物组合, 但对比研究结果显示万寿菊品种的 SRAP 多态性水平比矮牵牛(资料未列出)低, 且同一系列的杂交种不能完全聚为一类。这进一步印证了万寿菊品种遗传基础狭窄的事实, 同时反映出一些公司在规划品种系列时主要根据农艺性状与形态学指标, 同一系列的品种其遗传背景不一定很相近。另外, 万寿菊品种的聚类结果与花色的关联性不明显, 可能万寿菊的品种演化与花色相关基因没有必然的联系。在今后的育种材料选用时应充分注意这些信息。

References

- Ferriol M, Pico B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (2): 271–282.
- Ferriol M, Pico B, de Córdova, 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 (*Brassica 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 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 种质资源 SRAP 遗传分化分析. *作物学报*, 33 (11): 1862–1868.
- Li Fu-rong, Zhang Ji-chong, Xu Jiu-ru, Zhou Jian-hua. 2005. Studies on the cross-breeding of *Tagetes erecta* L. × *Tagetes patula* L. and the sterility of hybrid. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 26 (2): 51–54. (in Chinese)
- 李福荣, 张继冲, 续九如, 周建华. 2005. 万寿菊 × 孔雀草杂交育种及杂种不育性的研究. *内蒙古农业大学学报*, 26 (2): 51–54.
- Li Fu-rong. 2005. Study on inheritance and utilization of male sterile [Ph. D. Dissertation]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University.
- 李福荣. 2005. 万寿菊雄性不育的遗传与应用研究 [博士论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学.
- 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 *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (2–3): 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 Na, Zhao Jing-yun, Wang Ping, Guan Bai-li. 2006. Breeding report of marigold No. 9. *North Horticulture*, (1): 47–48. (in Chinese)
- 李娜, 赵景云, 王平, 关柏莉. 2006. 万寿菊 9 号选育报告. *北方园艺*, (1): 47–48.
- Li Xiao-hui, Tian Chao-yang, Wang Cong-yan. 2007. Genetic polymorphism analysis by sequence-related amplified polymorphism markers in *Citrullus lanatus*. *Biotechnology*, 17 (3): 23–26. (in Chinese)
- 李晓慧, 田朝阳, 王从彦. 2007. SRAP 分子标记分析西瓜遗传多态性. *生物技术*, 17 (3): 23–26.
- 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.
- Liang Shun-xiang, Tang Dao-cheng, Guo Jing, Yan Hui-qing. 2007. Analysis of POD isozyme on male sterile lines of marigold. *Journal of Qinghai University: Nature Science*, 25 (1): 46–50. (in Chinese)
- 梁顺祥, 唐道诚, 郭京, 闫辉清. 2007. 万寿菊雄性不育品系的 POD 同工酶分析. *青海大学学报: 自然科学版*, 25 (1): 46–50.
- Qi Ying-chun, Ning Guo-gui, Bao Man-zhu. 2007. Evaluation of genetic relationships of *Tagetes patula* inbred lines using ISSR markers and morphological traits. *Scientia Agricultura Sinica*, 40 (6): 1236–1241. (in Chinese)
- 齐迎春, 宁国贵, 包满珠. 2007. 应用 ISSR 分子标记和表型性状评价孔雀草自交系的遗传关系. *中国农业科学*, 40 (6): 1236–1241.
- Shen Yi-lan, Xu Jiu-ru, Li Fu-rong, Zhang Ji-chong. 2006. RAPD experiment protocol and optimization in marigold. *Jilin Forestry Science and Technology*, 35 (1): 10–14. (in Chinese)
- 沈一岚, 续九如, 李福荣, 张继冲. 2006. 万寿菊 RAPD 分子标记优化体系的建立. *吉林林业科技*, 35 (1): 10–14.
- Tian Hai-yan, Wang Ping, Shen Xiang-qun, Wang Zhi-gang, Zang Shu-zhen. 2007. Genetic analysis and botanical character in male sterile W205 AB line of marigold. *North Horticulture*, (2): 105–107. (in Chinese)
- 田海燕, 王平, 沈向群, 王志刚, 臧淑珍. 2007. 万寿菊 W205 雄性不育两用系的遗传及植物学特征研究. *北方园艺*, (2): 105–107.
- Verma S K, Singh R K, Arya R R. 2004. Evaluation of tagetes germplasm. *Scientific Horticulture*, 204: 13–19.
- Zhang Jun, Wu Yao-ting, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen. 2000. Fast screening of microsatellite markers in cotton with PAGE/silver staining. *Cotton Science*, 12 (5): 267–269. (in Chinese)
- 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 张天真. 2000. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测. *棉花学报*, 12 (5): 267–269.
- Zhao Jing-yun, Wang Ping, Li Na. 2005. Breeding report of marigold No. 7. *Greenhouse Horticulture*, (5): 58–60. (in Chinese)
- 赵景云, 王平, 李娜. 2005. 万寿菊 7 号选育报告. *温室园艺*, (5): 58–60.