

菊花品种资源遗传多样性的 AFLP 分析

韩 洁¹, 胡 楠², 李玉阁¹, 尚富德^{1*}

(¹河南大学生命科学学院, 农业生物技术研究, 河南开封 475001; ²南阳理工学院, 河南南阳 473000)

摘 要: 以 AFLP—银染分子标记技术, 对 45 个菊花品种进行了遗传多样性和亲缘关系分析。选用 10 个多态性高、分辨力强的 E + 3/M + 3 引物组合分别对供试材料的基因组 DNA 进行扩增, 共获得 486 条清晰可辨的条带, 其中多态性带 451 条, 平均每个引物组合可检测出 45.1 个多态性位点, 多态性位点百分率高达 92.80%, 这表明供试品种资源在 DNA 水平上酶切位点的分布存在广泛的变异。应用 DPS 软件计算供试品种遗传距离界于 0.36000 ~ 0.86237 之间, 平均为 0.61185; UPGMA 分析将 45 份资源分成 6 个类群, 从相异性系数分析了各品种资源间的亲缘关系。

关键词: 菊花; AFLP; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S 682.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-1041-06

Genetic Diversity of Chrysanthemum Cultivars Revealed by AFLP Analysis

HAN Jie¹, HU Nan², LI Yu-ge¹, and SHANG Fu-de^{1*}

(¹College of Life Sciences and Institute of Agricultural Biotechnology, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China;

²Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: The genetic diversity and relationship of 45 chrysanthemum cultivars were analyzed by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) - silver staining protocol. AFLP fingerprinting of 45 chrysanthemum cultivars with ten pairs of E + 3/M + 3 primers revealed a total number of 486 unambiguous bands, of which 451 were polymorphic and 45.1 polymorphic bands per pair of primer were produced on average. The polymorphism frequency was 92.80%. This result showed the abundant diversities of enzyme digestion sites among used chrysanthemum cultivars. As analyzed by DPSv3.01, the Nei's genetic distance of 45 chrysanthemum cultivars ranged from 0.36000 to 0.86237, and the average distance was 0.61185. These chrysanthemum cultivars were divided into six groups by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) based on Nei's genetic distances. The genetic relationship of 45 chrysanthemum cultivars was analyzed using the different coefficient.

Key words: Chrysanthemum; AFLP; Genetic diversity; Relationship

菊花 [*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat) Kitam] 属菊科 (Compositae) 菊属 [*Dendranthema* (DC.) DesMoul], 染色体数变化于 36 ~ 75 之间, 绝大多数品种为 6 倍体 ($2n = 6x = 54$) 或非整倍体。

菊花起源于中国, 品种资源丰富, 经长期人工杂交和自然选择, 遗传背景非常复杂, 不同地域间的品种交换导致同名异物、同物异名现象也很普遍。到目前为止, 对菊花品种的鉴别大多限于通过形态性状观察进行分类, 主要依据花型分为 5 大类。分子标记技术与数值分类方法相结合, 是研究植物

收稿日期: 2007 - 05 - 08; 修回日期: 2007 - 07 - 25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670137); 河南省高等学校创新人才培养工程基金项目; 河南大学自然科学基金项目 (05YBZR011)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fudeshang@henu.edu.cn)

遗传多样性和亲缘关系,从而合理利用与保护品种资源的有力工具。有关分子标记技术在菊花品种资源研究上应用的报道较少 (Huang et al, 2000; 秦贺兰 等, 2002; 卞阿娜和方份, 2003; Wang, 2003)。本研究采用 AFLP—银染技术,旨在从分子水平上探讨 45个菊花栽培品种的遗传多样性和亲缘关系,为更有效地保护和利用这些品种资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

45个菊花品种 (表 1) 全部来自河南省开封市禹王台公园,覆盖 5种瓣型, 24个花型, 5种花抱和 7个色系,包括未根据形态学分类的 5个新品种 (其中两个是开封市培育的)。于春季 4~5月采集菊花未完全展开的幼嫩叶片,保存于 -70℃ 冰箱中 (表 1)。

表 1 供试材料及其来源

Table 1 Origin and names of chrysanthemum cultivars used in this study

编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar
1	金蜂铃 Jinfengling	16	金冕 Jinnian	31	绿云 Lǜyun
2	蛟龙三变 Jiaolong Sanbian	17	姚黄 Yaohuang	32	大光明 Daguangming
3	汴梁腾云 Bianliang Tengyun	18	光辉 Guanghui	33	玉龙闹海 Yulong Naohai
4	红枫托桂 Hongfeng Tuogui	19	黄十八 Huangshiba	34	玉龙戏水 Yulong Xishui
5	红毛刺 Hongmaoci	20	二乔 Erqiao	35	白翎管 Bailingguan
6	粉托桂 Fentuogui	21	绿鹦鹉 Lǜyǐngwǔ	36	犀玉满头 Xiyu Mantou
7	冬云 Dongyun	22	大地春光 Dadi Chunguang	37	长生乐 Changshengle
8	泥金豹 Nijinbao	23	潍坊粉楼 Weifang Fenlou	38	白十八 Baishiba
9	紫霞瑞光 Zixia Ruiguang	24	广东黄 Guangdong Huang	39	墨麒麟 Moqilin
10	百鸟朝凤 Bainiao Chaofeng	25	黄山云雾 Huangshan Yunwu	40	汴梁紫玉 Bianliang Ziyu
11	卷云 Juanyun	26	朱砂夔龙 Zhusha Kuilong	41	银盘托桂 Yinpan Tuogui
12	紫绒 Zirong	27	福寿舞 Fushouwu	42	绿松针 Lǜsongzhen
13	追鱼 Zhuiyu	28	墨魁 Mokui	43	瑞雪祈年 Ruixue Qinian
14	梅花鹿 Meihualu	29	金龙爪 Jinlongzhua	44	独立寒秋 Dulihanqiu
15	黄香梨 Huangxiangli	30	小绿云 Xiaolǜyun	45	陶然醉 Taoranzui

1.2 菊花 DNA 的提取

参考有关文献 (郭宝林 等, 2000; 蒋细旺 等, 2002), 采用改良 SDS法, 获得纯度符合要求的菊花基因组 DNA 模板, 稀释为 80 ng/μL 浓度备用。

1.3 AFLP—银染

AFLP-PCR 扩增参考 Vos 等 (1995) 的方法, 采用 *EcoR*/*Mse* 双酶切, 所用酶、缓冲液、接头、引物均由上海生工公司提供。凝胶电泳参考 Vos 等 (1995) 方法并加以改进, 采用 7% 浓度 (丙烯酰胺 甲叉丙烯酰胺 = 19:1) 的变性聚丙烯酰胺凝胶 (含尿素 7 mol/L), 在 3 000 V、300 mA、80 W 条件下预电泳 0.5 h, 3 000 V、300 mA、55 W 条件下电泳 2.5 h, 电泳液为 1×TBE。银染程序参考 Bassam 等 (1991) 方法并加以改进。通过预试验共筛选出 10 对扩增条带多态性较高的选择性扩增引物, 对供试材料进行多态性分析。

1.4 数据处理

AFLP 扩增产物以 0、1 统计, 建立由 “0、1” 组成的原始数据矩阵。对非常清晰的带, 在相同迁移位置上有带的记为 1 (包括强带和可分辨的弱带), 无带的记为 0, 形成二元数据, 统计各引物的位点。采用 DPSv3.11 版本软件对统计结果进行 UPGMA 分析 (唐启义和冯明光, 2002), 构建系统聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 供试材料的 AFLP 扩增结果

采用 10 对分辨能力强的引物, 分别对供试材料的基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 486 条带, 其中多态性条带 451 条。各对引物扩增所得条带数、多态性带数和多态性见表 2, 其中引物 E-ACC/M-CTG 扩增所得条带数最多 (62 条), 引物 E-ACC/M-CAA 最少 (28 条); 引物 E-AGG/M-CTC 扩增多态性最高 (97.62%), 引物 E-ACC/M-CTG 最低 (83.87%)。平均每对引物扩增出 48.6 条带, 多态性带 45.1 条, 多态性比率 92.80%。由于 AFLP 揭示的是基因组 DNA 在酶切位点和其后选择性扩增碱基的差异, 因此本试验结果显示, 供试菊花品种之间在 DNA 水平上酶切位点的分布存在广泛差异, 这与菊花长期人工杂交和自然选择造成的遗传背景十分复杂有关。

图 1 是引物 E-ACC/M-CTG 对 45 个品种扩增的结果。

表 2 供试材料的 AFLP 扩增结果

Table 2 The AFLP amplified result of chrysanthemum cultivars

引物组合 Primer combination	总带数 Total number of AFLP band	多态性带数 Polymorphic band	多态性 Polymorphism (%)
E-AGG/M-CAA	41	36	87.80
E-AGG/M-CTG	58	56	96.55
E-AGG/M-CTC	42	41	97.62
E-ACC/M-CAA	28	24	85.71
E-ACC/M-CCA	44	42	95.45
E-ACC/M-CTG	62	52	83.87
E-ACC/M-CTC	58	56	96.55
E-AAG/M-CAG	47	44	93.62
E-AAG/M-CAC	51	48	94.12
E-AAG/M-CTG	55	52	94.55
总计 Total	486	451	
平均 Average	48.6	45.1	92.80

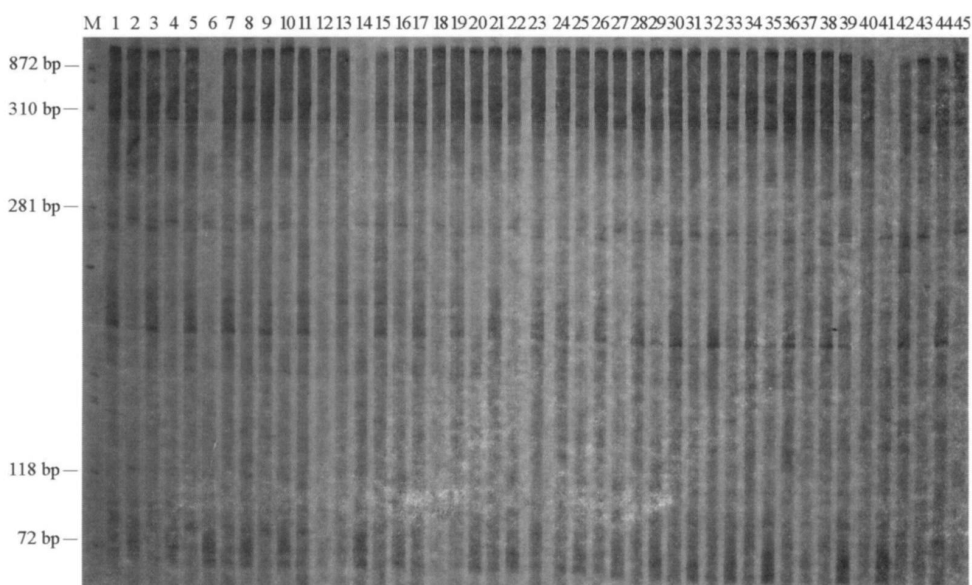


图 1 供试品种的 AFLP 指纹图谱 (E-ACC/M-CTG)

1~45: 1~45 号品种的 AFLP 指纹。

Fig 1 AFLP fingerprinting patterns of 45 chrysanthemum cultivars using primer combination E-ACC/M-CTG

Lane 1 - 45 indicate the results of AFLP carried out from the 45 chrysanthemum cultivars M: DNA marker

2.2 供试材料的遗传距离

通过 AFLP检测, 获得 451 × 45的多态位点矩阵, 据此计算 Nei氏遗传距离。结果表明, 45个品种之间遗传距离的变异范围在 0.36000 ~ 0.86237之间, 平均为 0.611185; 独立寒秋和陶然醉两个品种的遗传距离最近, 为 0.36000; 其次为福寿舞和墨魁两个品种之间, 遗传距离为 0.43860; 独立寒秋和金蜂铃之间遗传距离最远, 为 0.86237; 其次为小绿云和金蜂铃两个品种之间, 遗传距离为 0.82797。

2.3 供试材料的聚类分析

根据各品种的 Nei氏遗传距离矩阵, 利用 UPGMA法进行聚类分析, 结果如图 2所示。为便于分析, 在平均遗传距离 0.77752处做结合线 L。L将 45个品种分为 6个品种群。品种群 I 又明显分为两个组。第 1组包括 18个品种: 金蜂铃、蛟龙三变、光辉、长生乐、墨麒麟、汴梁腾云、红枫托桂、黄十八、黄山云雾、朱砂夔龙、二乔、绿鹦鹉、大地春光、白十八、泥金豹、金冕、追鱼、紫霞瑞光; 第 2组包括 13个品种: 红毛刺、黄香梨、卷云、紫绒、汴梁紫玉、银盘托桂、姚黄、潍坊粉楼、广东黄、绿松针、瑞雪祈年、冬云、百鸟朝凤。品种群 II 包括粉托桂和犀玉满头两个品种。品种群 III 包括梅花鹿、福寿舞、墨魁、金龙爪和白翎管 5个品种。品种群 IV 包括小绿云、绿云、大光明和玉龙闹海 4个品种。品种群 V 仅有玉龙戏水 1个品种。品种群 VI 包括独立寒秋和陶然醉两个品种。

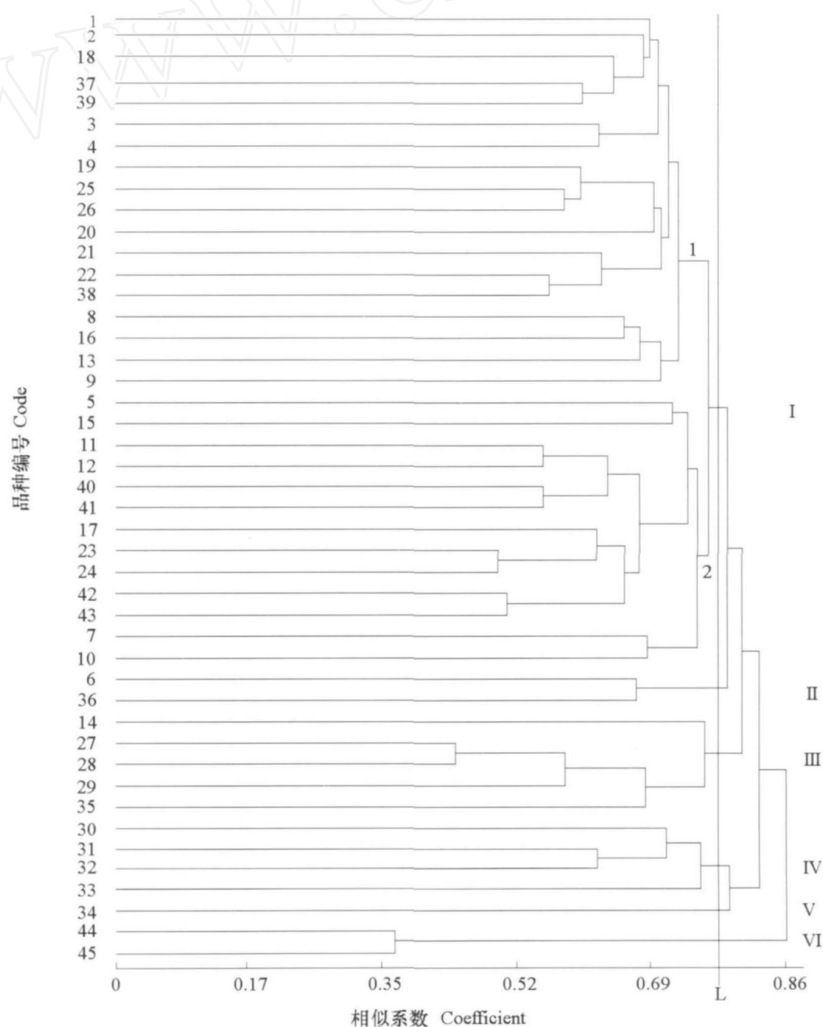


图 2 基于 AFLP标记以 UPGMA法构建的 45个菊花品种的分子系统树

Fig. 2 The dendrogram of 45 chrysanthemum cultivars based on AFLP bands using UPGMA cluster analysis

从聚类图上可以看出各品种之间的亲缘关系及其在分类上的系统位置。该结果与传统的形态分类结论既有相符合处,也有一定差异。Dowrick和 El-Bayoumi (1966)、李懋学等 (1983) 认为在菊花花径与染色体数之间存在正相关趋势。《中国菊花》(李鸿渐, 1993) 和《中国作物遗传资源》(中国农学会遗传资源分会, 1994) 中的菊花花型分类方案中,都首先依据花序大小或者染色体组大小,将菊花划分为小菊系与大菊系两个品种群。花序大小由花序直径和花序高度两个因素决定。

本研究聚类结果中,有多处与上述观点相一致,例如在品种群 中,绿云和大光明花序直径相近,因而首先聚在一起,其次是小绿云,再次是玉龙闹海,依花序直径与花序高度渐次减小的趋势先后聚在同一群中;又如品种群 的第 1 组中,泥金豹与金冕花序直径与花序高度相近,首先聚在一起,其次为追鱼,再次为紫霞瑞光,依花序直径与花序高度渐次增大的趋势先后聚在一起。由此可见,花序大小或者染色体组大小,对菊花品种分类具有重要的参考价值。

在菊花栽培品种的进化历程中,越晚出现的花色,其遗传物质在菊花基因库中占有越大的比例,因此不同花色具有不同的遗传力。在菊花的花色遗传中,除偏母性遗传外,还存在不完全显性和镶嵌显性两种遗传现象。栗茂腾等 (2005) 推测,花色嵌合现象的发生可能是由于转座子的插入影响与色素合成的有关基因,以及转座子转座的时间和转座频率不同造成的。而转座子的插入有可能使酶切位点改变,进而影响 AFLP 带型的多态性,使某些分子水平的多态性在本研究中不能体现出来。

此外,品种银盘托桂与汴梁紫玉聚在一起,通过形态分类与聚类结果的比较,与李鸿渐 (1993) 描述的小花型银盘托桂差异较大,提示本研究中所采用的银盘托桂应是中大花型,这可能是同名异物现象。而广东黄与潍坊粉楼、姚黄聚在一起,根据形态和聚类结果分析,具有很高一致性,应与李鸿渐 (1993) 中记载的广州黄是同一品种,这可能是同物异名现象。

郝京辉等 (2003) 曾报道,对菊花品种的定性二元性状、定性多态性状和数量性状进行稳定性、一致性和特异性分析,发现作为品种鉴定重要性状 3 个定性多态形状即花瓣先端形状、舌状花表面色彩分布和花簇的形状,因人为主观判断性强,其特异性表现较差;而作为重要观赏和测试性状的大部分数量性状如花瓣长度、花瓣宽度、筒状花全长、花径大小和植株高度等,其一致性和稳定性表现也不好。

本研究的聚类结果,没有完全与传统形态分类相符合,而是多数在形态上相同花型或相同花色的品种都没有聚在一起。分析原因,一方面可能是材料的选择难以完全覆盖菊花的遗传背景(例如转座子插入影响花色遗传,导致菊花花色的多样性极为丰富),另一方面可能如上述报道所说是分析方法的差异造成聚类不够完全。

3 讨论

菊花是菊属植物中进化程度较高的种,各栽培品种在许多性状上表现为平行进化,如花色、重瓣性、舌状花形态等。各种性状独自平行进化的特性,决定了菊花品种变异的丰富多彩 (Wang, 2003)。许多性状如形态学、生物化学和生理学指标受环境变化的影响,产生连续性变异或高度可塑性,多数形态指标甚至受个体发育阶段的影响,这给品种性状的正确描述以及品种鉴定和亲缘关系的确定带来困难 (戴思兰和陈俊愉, 1997)。

采用 AFLP 分析技术,不同长度的扩增片段对应着基因组上不同的位点,不同样品 AFLP 带型的差异反应了其在 DNA 水平上的酶切位点分布的差异。因此可以将每一扩增片段看作其基因组的一个特征,这种特征不仅数目众多,而且不受环境影响,所以非常稳定可靠。AFLP 技术也因此成为研究遗传多样性的有利工具。本研究采用 AFLP—银染技术,用 10 对引物检测出 451 个多态性位点,相当于分析了 451 个有差异的性状,这是传统分类及其他分子标记方法难以做到的,因此证实了 AFLP—银染技术在菊花栽培品种遗传多样性和亲缘关系分析中的高效性。

中国菊花的地域交流自古就很活跃, 公元 8 世纪时中华名菊始经朝鲜东传日本。现在, 国际交流日益频繁, 菊花种质中引入的外源基因也日益丰富, 导致菊花新品种源源不断涌现。因本研究未能涉及野生菊花, 所采用的 45 个品种也并不能代表菊花的全部遗传背景, 因此有关菊花的遗传多样性有待进一步深入研究。

References

- Bassam B J, Caetano-Anollé G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80 - 83.
- Bian A-na, Fang Fen. 2003. Analysis of peroxidase isozyme of leaves in seven cultivars of chrysanthemum. *Journal of Zhangzhou Teachers College (Nat Sci)*, 16 (1): 78 - 81. (in Chinese)
- 卞阿娜, 方 份. 2003. 菊花 7 个品种过氧化物酶同工酶分析. *漳州师范学院学报 (自然科学版)*, 16 (1): 78 - 81.
- China Association of Agricultural Science Societies Genetic Resources Branch. 1994. Crop genetic resources in China. Beijing: China Agricultural Press: 1282. (in Chinese)
- 中国农学会遗传资源学会. 1994. 中国作物遗传资源. 北京: 中国农业出版社: 1282.
- Dai Si-lan, Chen Jun-yu. 1997. A cladistic study on some *Dendranthema* SSP. in China. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 15 (1): 27 - 34. (in Chinese)
- 戴思兰, 陈俊愉. 1997. 中国菊属一些种的分支分类学研究. *武汉植物学研究*, 15 (1): 27 - 34.
- Dowrick G J, El-Bayoumi A. 1966. The origin of new forms of the garden chrysanthemum. *Euphytica*, 15: 32 - 50.
- Guo Bao-lin, Li Jia-shi, Yan Yu-ning. 2000. The technical aspects of DNA molecular markers in the study of Chinese traditional and herbal drugs. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 31 (12): 951 - 954. (in Chinese)
- 郭宝林, 李家实, 阎玉凝. 2000. 中药材 DNA 分子标记研究的技术问题. *中草药*, 31 (12): 951 - 954.
- Hao Jing-hui, You Jie, Qin He-lan, Yi Ming-fang. 2003. Study of the distinctness, uniformity and stability of chrysanthemum cultivars. *Journal of Central South Forestry University*, 23 (5): 14 - 18. (in Chinese)
- 郝京辉, 游 捷, 秦贺兰, 义鸣放. 2003. 菊花品种的特异性、一致性和稳定性的研究. *中南林学院学报*, 23 (5): 14 - 18.
- Huang S C, Tsai C C, Sheu C S. 2000. Genetic analysis of chrysanthemum hybrids based on RAPD molecular markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41: 257 - 262.
- Jiang Xi-wang, Bao Man-zhu, Li Zhi-qi, Zhang Qian. 2002. Optimize method for isolation of DNA from chrysanthemum. *Journal of Jiangnan University (Natural Sciences)*, 19 (3): 42 - 44. (in Chinese)
- 蒋细旺, 包满珠, 李智崎, 张 倩. 2002. 菊花 DNA 提纯方法的优化. *江汉大学学报 (自然科学版)*, 19 (3): 42 - 44.
- Li Hong-jian. 1993. Chrysanthemums in China. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House: 71 - 72. (in Chinese)
- 李鸿渐. 1993. 中国菊花. 南京: 江苏科学技术出版社: 71 - 72.
- Li Mao-teng, Yu Long-jiang, Wang Li-mei, Liu Jian-min, Lei Cheng. 2005. The heredity of flower colors and the discovery of flower color chimeras chrysanthemum species. *Hereditas*, 27 (6): 948 - 952. (in Chinese)
- 栗茂腾, 余龙江, 王丽梅, 刘建民, 雷 呈. 2005. 菊花花色遗传及花色嵌合体发现. *遗传*, 27 (6): 948 - 952.
- Li Mao-xue, Zhang Xiao-fang, Chen Jun-yu. 1983. The cytology study of some wild and cultivated chrysanthemum in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 10 (3): 199 - 206. (in Chinese)
- 李懋学, 张 方, 陈俊愉. 1983. 我国某些野生和栽培菊花的细胞学研究. *园艺学报*, 10 (3): 199 - 206.
- Qin He-lan, You Jie, Gao Jun-ping. 2002. RAPD analysis of 18 chrysanthemum cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (5): 488 - 490. (in Chinese)
- 秦贺兰, 游 捷, 高俊平. 2002. 菊花 18 个品种的 RAPD 分析. *园艺学报*, 29 (5): 488 - 490.
- Tang Qi-yi, Feng Ming-guang. 2002. Practicality statistic analysis and DPS data program system. Beijing: Science Press: 185 - 260. (in Chinese)
- 唐启义, 冯明光. 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社: 185 - 260.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijnders M, van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407 - 4414.
- Wang C Y. 2003. Evaluation of genetic diversity of chrysanthemum using AFLP markers. *Dutch-Chinese Life Science Forum 2003*, Wageningen, The Netherlands.