

基于 ISSR 标记的 62 个朱顶红品种的遗传关系分析及指纹图谱构建

张林^{1,2}, 徐迎春¹, 成海钟^{2,①}, 周玉珍², 娄晓鸣², 吕文涛²

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 苏州农业职业技术学院, 江苏 苏州 215008)

摘要: 采用 ISSR 标记方法分析了 62 个朱顶红 (*Hippeastrum* spp.) 品种 (包含 60 个引自荷兰的品种和 2 个苏州本地品种) 的遗传多样性, 并采用 UPGMA 法对 62 个朱顶红品种进行聚类分析。在此基础上, 通过特异性条带的比较及筛选, 采用黑白方格示意图法构建了供试品种的 ISSR 指纹图谱。扩增结果显示: 用 11 条引物从 62 个朱顶红品种的基因组 DNA 中共扩增出 118 条带, 其中多态性条带 109 条, 多态性条带百分率达 92.4%, 有 5 条引物扩增条带的多态性条带百分率达 100.0%。62 个品种间的遗传相似系数变幅较大, 为 0.371 4~0.842 9, 表明各品种间存在丰富的遗传变异和遗传多样性。聚类分析结果显示: 在遗传相似系数 0.63 处 62 个品种被分为 7 组, 多数形态相似的品种被聚在一起; 其中形态相似的白色单瓣品种间遗传相似系数较高 (约 0.8), 大多聚在一起, 表明它们同源性较高; 而 2 个苏州本地品种间遗传相似系数最高 (0.842 9), 表明它们可能具有同一来源。品种‘小红星’在引物 UBC873 扩增图谱的 450 bp 处有 1 条特异性条带, 而品种‘精灵’在引物 UBC835 扩增图谱的 3 000 bp 处有 1 条特异缺失条带, 这 2 条特异性条带可分别用于品种‘小红星’和‘精灵’的鉴定。基于引物 UBC835 和 UBC873 的 ISSR 扩增条带组合构建了供试的 62 个朱顶红品种的 ISSR 指纹图谱, 采用这一指纹图谱可对供试的所有朱顶红品种进行鉴定。

关键词: 朱顶红品种; ISSR 标记; 聚类分析; 遗传关系; 指纹图谱; 品种鉴定

中图分类号: Q946-33; S682.2*5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)04-0048-07

Genetic relationship analysis and fingerprint construction of 62 cultivars of *Hippeastrum* spp. based on ISSR marker ZHANG Lin^{1,2}, XU Ying-chun¹, CHENG Hai-zhong^{2,①}, ZHOU Yu-zhen², LOU Xiao-ming², LÜ Wen-tao² (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou 215008, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(4): 48-54

Abstract: The genetic diversity of 62 cultivars (including 60 cultivars introduced from Netherlands and 2 local cultivars in Suzhou) of *Hippeastrum* spp. was analyzed by ISSR marker method, and the cluster analysis on 62 cultivars was carried out by UPGMA method. On the basis, by means of comparison and selection of specific bands, the ISSR fingerprint of tested cultivars was constructed by ways of schematic diagram with black and white square lattices. The amplification result shows that total 118 bands are amplified from genomic DNA of 62 cultivars by 11 primers, in which, there are 109 polymorphic bands with the polymorphic band percentage (PPB) of 92.4%, and PPB of bands amplified by five primers reaches to 100.0%. The change range of genetic similarity coefficient among 62 cultivars is larger with a value from 0.371 4 to 0.842 9, showing that there are rich genetic variation and genetic diversity among different cultivars. The cluster analysis result shows that 62 cultivars can be divided into seven groups at the genetic similarity coefficient of 0.63. Most cultivars with similar morphology are clustered together, in which the genetic similarity coefficient among some similar morphology cultivars with white and single petal is higher (about 0.8) and most of these cultivars are clustered together, indicating that their

收稿日期: 2011-11-15

基金项目: 江苏省科学技术厅高技术项目 (BE2009327); 江苏省农业三项工程项目 [SX(2010)47]

作者简介: 张林 (1987—), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事观赏植物种质资源保存和评价研究。

①通信作者 E-mail: sn1907@163.com

homology is higher. While, two local cultivars in Suzhou have the highest genetic similarity coefficient (0.842 9), meaning that the two cultivars may possess a same origin. Cultivar 'Xiaohongxing' has a specific band at 450 bp in amplification pattern of primer UBC873 and cultivar 'Elvas' has a specific missing band at 3 000 bp in amplification pattern of primer UBC835, therefore, these two specific bands can be used for identification of cultivars 'Xiaohongxing' and 'Elvas', respectively. According to ISSR amplification bands by primers UBC835 and UBC873, the ISSR fingerprint of 62 cultivars is combined and constructed, and all of cultivars tested can be identified with this fingerprint.

Key words: cultivar of *Hippeastrum* spp.; ISSR marker; cluster analysis; genetic relationship; fingerprint; cultivar identification

朱顶红(*Hippeastrum* spp.)原产于中南美洲,为石蒜科(Amaryllidaceae)朱顶红属(*Hippeastrum* Herb.)所有种类的总称,其花大色艳、叶形优美,具有较高的观赏价值。目前,国内朱顶红产业迅速发展,但在生产实践中应用的品种主要引自荷兰,且自主培育的新品种还处于起步阶段。朱顶红杂交品种较原种有观赏价值高、环境适应性强等优点,但在长期选育过程中原种已丢失,加之对引进品种的遗传背景并不了解,无法确定大部分栽培品种的亲缘关系^[1]。经过长期的人工栽培选育,朱顶红存在较大的遗传分化,遗传多样性高,采用传统的分类方法很难区分其种下类群及品种^[2]。

ISSR 标记引物为随机引物,无需预先知道基因组序列,具有成本低、条带清晰且重复性好的特点。目前,ISSR 标记已用于鸢尾(*Iris tectorum* Maxim.)^[3]、茶[*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.]^[4]、桂花[*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.]^[5]、红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)^[6]、桑树(*Morus alba* L.)^[7]和菊花[*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.]^[8]等植物的遗传多样性研究以及通过构建 ISSR 指纹图谱进行品种鉴定。刘本英等^[4]利用 4 条 ISSR 引物组合对 40 份云南大叶种茶树种质资源进行了鉴别;李梅等^[5]利用引物 ISSR12 和 ISSR27 鉴别了 84 份桂花种源。目前,Chakrabarty 等^[9]采用 RAPD 标记确定出部分杂交朱顶红品种的亲缘关系,但有关朱顶红 ISSR 标记鉴定的相关研究尚未见报道。

作者以 2 个来自苏州本地的朱顶红品种和 60 个引自荷兰的朱顶红品种为研究对象,利用 ISSR 分子标记技术进行遗传多样性分析,以期揭示朱顶红不同品种间的亲缘关系、构建 62 个朱顶红品种的 ISSR 指纹图谱,为朱顶红杂交亲本的选择以及新品种鉴定提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 62 个朱顶红品种均采集于苏州农业职业技术学院园艺中心,其中 60 个品种引自荷兰,分别为‘苹果花’(‘Apple Blossom’)、‘橙色塞维’(‘Orange Sovereign’)、‘维拉’(‘Vera’)、‘简女士’(‘Lady Jane’)、‘玛丽’(‘Mary Lou’)、‘卡里美柔’(‘Calimero’)、‘红孔雀’(‘Red Peacock’)、‘哈库’(‘Hercules’)、‘蒙特布朗’(‘Mont Blanc’)、‘红狮’(‘Red Lion’)、‘双迹’(‘Double Record’)、‘萨德’(‘Pasadena’)、‘安迪’(‘Andes’)、‘女神’(‘Aphrodite’)、‘当娜’(‘Donau’)、‘帆船’(‘Benfica’)、‘所罗门’(‘Solomon’)、‘粉色精华’(‘Pink Blossom’)、‘精灵’(‘Elvas’)、‘花孔雀’(‘Blossom Peacock’)、‘舞蹈皇后’(‘Dancing Queen’)、‘凤蝶’(‘Papilio’)、‘极品’(‘Best Seller’)、‘雅典娜’(‘Athene’)、‘贝贝星’(‘Baby Star’)、‘波利舞曲’(‘Bolero’)、‘卡门’(‘Carmen’)、‘丁克’(‘Celica’)、‘诱惑’(‘Charisma’)、‘圣诞礼物’(‘Charismas Gift’)、‘小丑’(‘Clown’)、‘希望’(‘Desire’)、‘俏皮玫瑰’(‘Donau Rose’)、‘小精灵’(‘Fairytale’)、‘游戏’(‘Faro’)、‘白孔雀’(‘White Peacock’)、‘园艺师’(‘Floris Hekkere’)、‘希望’(‘Green Goddess’)、‘自由’(‘Liberty Donker’)、‘耀眼的路德维格’(‘Ludwig Dazzler’)、‘曼波乐曲’(‘Mambo’)、‘奥拉夫’(‘Olaf’)、‘奥林帕斯’(‘Olympus’)、‘帕梅拉’(‘Pamela’)、‘花边香石竹’(‘Picotee’)、‘红里花边香石竹’(‘Picotee Red Lining’)、‘鸡尾酒’(‘Piquant’)、‘序曲’(‘Prelude’)、‘约翰逊’(‘President Johnson’)、‘承诺’(‘Promise’)、‘快车’

(‘Rapido’)、‘罗马’(‘Roma’)、‘桑河’(‘San Remo’)、‘明星’(‘Showmaster’)、‘苏珊’(‘Susan’)、‘珍品’(‘Unique’)、‘火焰孔雀’(‘Flaming Peacock’)、‘小红星’(‘Xiaohongxing’)、‘阿尔卑斯之角’(‘Matterhorn’)和‘月光’(‘Moonlight’);另有 2 个品种为苏州本地品种。每个品种采集 1 个单株的嫩叶,置于硅胶中干燥,带回实验室于 4 ℃冰箱中保存、备用。

参考加拿大哥伦比亚大学(UBC)的引物设计 ISSR 引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和 10×PCR buffer 等购于宝生物工程(大连)有限公司,Marker 购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;AG22331 型梯度 PCR 扩增仪为 Eppendorf 公司产品。

1.2 方法

采用 CTAB 法^[10]提取基因组 DNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计(日本岛津公司)检测 DNA 质量和浓度,并稀释至 20 ng·μL⁻¹。ISSR-PCR 扩增体系总体积 20 μL,其中包含 Taq DNA 聚合酶 1.0 U、模板 DNA 40 ng、10×PCR buffer 2 μL,其他成分终浓度分别为 Mg²⁺ 1.5 mmol·L⁻¹、dNTPs 0.15 mmol·L⁻¹、引物 0.50 μmol·L⁻¹。扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 40 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,38 个循环;最后于 72 ℃延伸 8 min。反应产物置于 4 ℃条件下保存。PCR 产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg·L⁻¹溴化乙锭)进行电泳检测,电泳缓冲液为 0.5×TBE,电泳时电压为 5 V·cm⁻¹;电泳结束后在凝胶成像系统仪(上海天能科技有限公司)上观测、分析并拍照。

以形态特征差异大的朱顶红品种的基因组 DNA 为模板,利用上述扩增体系和程序从 100 条 ISSR 引物中筛选适宜引物及各引物适宜的退火温度。引物筛选条件:连续 2 次梯度 PCR 后条带清晰且不弥散、条带重复出现、具有较高多态性。适宜退火温度则选择适宜温度范围内偏高的温度。筛选出的引物及退火温度用于所有供试样品的 PCR 扩增反应。

1.3 数据记录与分析

根据电泳结果,记录清晰可重复的 DNA 电泳条带;对于同一引物的扩增产物,迁移率相同的条带记为 1 个位点,同一位点上有条带记为“1”,无条带记为“0”。只记录易于辨认的条带,排除模糊不清的条带;迁移率相同但强度不同的条带均记为“1”^[11]。采集

的数据输入 Excel 2010 工作表,建立表征数据矩阵;运用 NTSYS-PC(2.10e 版)软件计算 62 个品种间的遗传距离和遗传相似系数,并进行 UPGMA 聚类分析。

由于针对所有朱顶红品种的基因组 DNA 用同一引物扩增出的条带有差异,因此可以利用条带差异进行品种鉴定。首先,针对所有供试品种,对 11 个引物的扩增条带进行一一比对,选出鉴别能力强的引物;然后对由鉴别能力强的引物扩增出的电泳条带进行形象化处理,同一位点上记为“1”的条带用黑方块表示、记为“0”的条带用白方块表示,由此构建 62 个朱顶红品种的 DNA 指纹图谱。

2 结果和分析

2.1 ISSR-PCR 扩增结果分析

从 100 个 ISSR 引物中筛选出多态性高、重复性好的 11 条引物(表 1),分别以 62 个朱顶红品种的基因组 DNA 为模板,在 300~3 000 bp 内共扩增出 118 条带,平均每个引物扩增出 10.7 条带。其中,多态性条带 109 条,多态性条带百分率高达 92.4%;引物 UBC834、UBC836、UBC840、UBC850 和 UBC857 的多态性条带百分率达到 100.0%;多态性条带百分率最低的为引物 UBC862,仅 76.9%。由此可见,供试的 62 个朱顶红品种具有较丰富的遗传多样性。

在 11 条引物中,8 条引物为二核苷酸重复序列,2 条引物为三核苷酸重复序列,1 条引物为四核苷酸重复序列,表明朱顶红基因组中以二核苷酸重复序列居多,其中 5 条是碱基 A-G 或 G-A 重复引物。在朱顶红基因组 DNA 复制过程中,由于与 A-G 或 G-A 重复序列结合的靶序列可能存在滑动和不均等交换现象,从而较易引起引物结合位点和两结合位点之间片段长度的差异^[12]。

2.2 基于遗传相似系数的 62 个朱顶红品种的聚类结果分析

以 62 个朱顶红品种的 118 条谱带数据建立原始矩阵,获得两两品种间的遗传相似系数 1 891 个;其中,2 个苏州本地品种间的遗传相似系数最大,达到 0.842 9;品种‘安迪’与‘桑河’间的遗传相似系数最小,仅 0.371 4。基于 1 891 个遗传相似系数,采用 UPGMA 法构建了供试 62 个朱顶红品种的聚类图(见图 1)。在聚类图上于遗传相似系数 0.63 处可将 62 个供试品种分为 A、B、C、D、E、F 和 G 组。

表1 用于62个朱顶红品种基因组DNA ISSR标记分析的引物序列及其扩增结果

Table 1 Primer sequences used for ISSR marker analysis of genomic DNA of 62 cultivars of *Hippeastrum* spp. and their amplification results

引物 Primer	5'→3'引物序列 ¹⁾ 5'→3' primer sequence ¹⁾	扩增条带数 Number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYTT	8	8	100.0
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYCT	15	13	86.7
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYTA	7	7	100.0
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYTT	10	10	100.0
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYCT	9	8	88.9
UBC848	CACACACACACACACARG	11	10	90.9
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGYCT	10	10	100.0
UBC857	ACACACACACACACACYG	13	13	100.0
UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	13	10	76.9
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	10	9	90.0
UBC873	GACAGACAGACAGACA	12	11	91.7

¹⁾ Y: 代表碱基 C 或 T Representing base C or base T; R: 代表碱基 A 或 G Representing base A or base G.

A组共包含42个品种,大部分白色品种包含在此组中,包括供试品种中惟一的重瓣白色品种‘白孔雀’以及4个单瓣白色品种‘阿尔卑斯之角’、‘蒙特布朗’、‘雅典娜’和‘耀眼的路德维格’;4个单瓣白色品种仅在花瓣宽度和花瓣顶端卷曲度上有区别,其中‘雅典娜’和‘耀眼的路德维格’的形态特征极其相似。此组还包括重瓣纯红色品种‘红孔雀’以及12个单瓣红色品种和24个红白相间品种。在24个红白相间品种中,‘花边香石竹’、‘红里花边香石竹’和‘约翰逊’这3个白色红边品种的形态特征极其相似,在图1中被聚在一起,三者间的两两遗传相似系数平均为0.8143,处于较高水平,表明这3个品种具有较高的同源性。在供试的62个品种中,遗传相似系数最高(0.8429)的是编号为59号和60号的2个苏州本地品种,在图1中被聚在一起,表明两者遗传关系较近,且其形态特征几乎完全一致,据此推测可能是早期不同地区引进的同一品种,但目前无法追寻它们的遗传背景。

B组共包含10个品种,其中包括供试品种中惟一的绿色品种‘月光’,并与本组惟一的白色品种‘希望’聚在一起,两者遗传相似系数达到0.8000,表明绿色品种与白色品种的遗传关系较近,这与已知朱顶红花色遗传背景规律之一的“绿色和白色的花都没有色素表达^[13]”相符。此组还包含3个红边白条纹品种‘曼波乐曲’、‘鸡尾酒’和‘承诺’,其中‘曼波乐曲’和‘鸡尾酒’在形态上极其相似。另外还包含1个红色重瓣品种‘丁克’和4个红色品种‘当娜’、‘奥林帕斯’、‘小红星’和‘波利舞曲’,其中‘当娜’、‘奥林帕

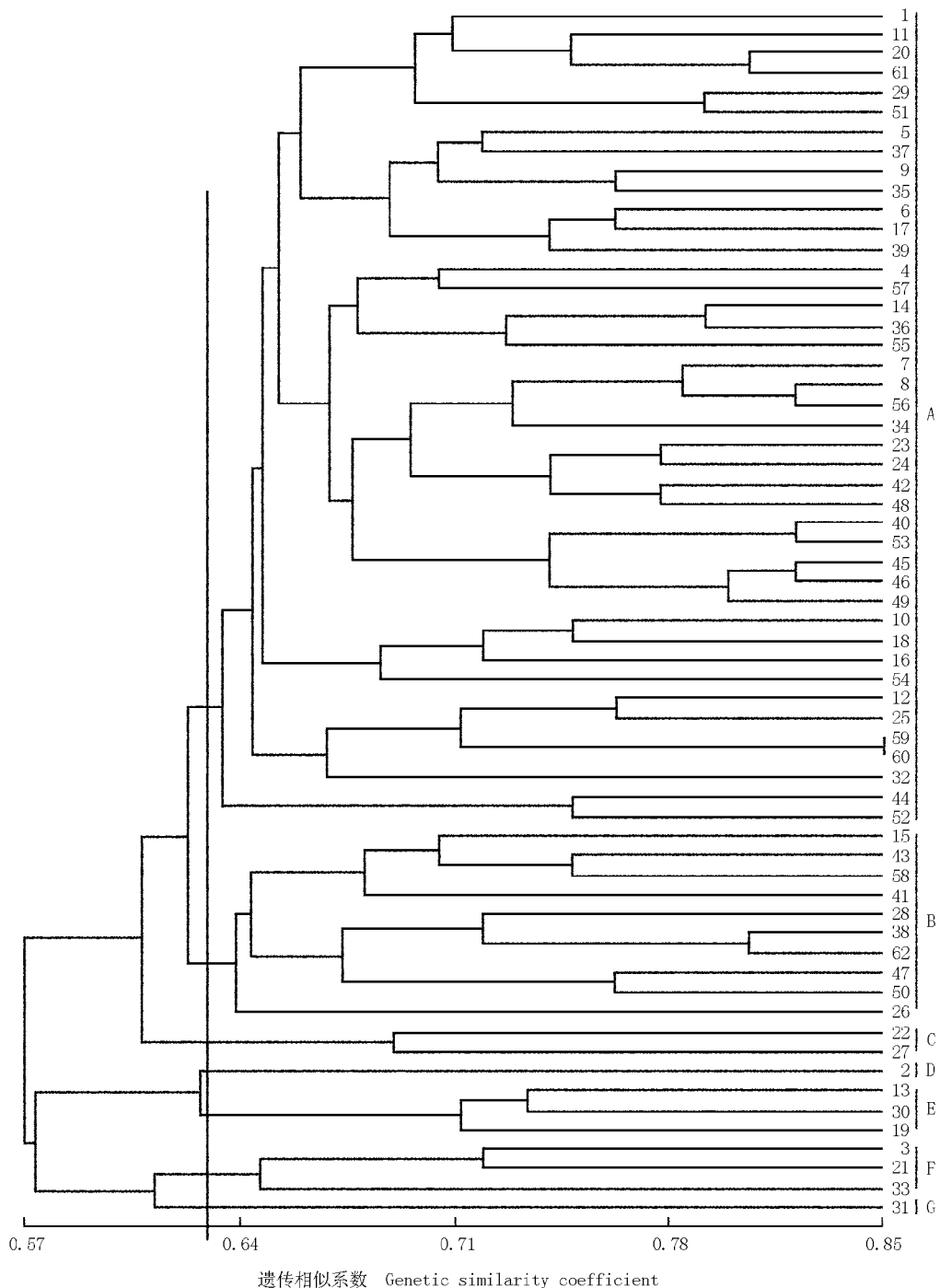
斯’和‘小红星’3个品种被聚在一起,可能是由于地域或来源一致等原因而具有较近的遗传关系。

除上述2组外,其他几组包含的品种均较少。C组包含‘凤蝶’和‘卡门’2个品种,其中‘凤蝶’具有花型花色较独特及可常绿越冬等优良性状,是较原始的育种材料,与多数杂交种有亲缘关系,目前仍然是朱顶红育种的重要亲本之一。D组只包含‘橙色塞维’1个品种,是较常见的单瓣红色品种。E组包含‘安迪’、‘精灵’和‘圣诞礼物’3个品种,虽然聚在一起,但它们的遗传相似系数均不大,‘安迪’和‘精灵’是重瓣红白相间品种,而‘圣诞礼物’是供试品种中惟一不包含在A、B两个大组中的单瓣白色品种。F组包含‘维拉’、‘舞蹈皇后’和‘俏皮玫瑰’3个品种,其中‘维拉’是较少见的全粉色品种。G组只包含‘小丑’1个品种,是观赏性较高的单瓣红白条纹品种。

从聚类图中还可见:虽然供试的62个品种并没有按照地域区分,也不是简单地按照花瓣单重瓣及花色分组,但是有很多形态极其相似的品种被聚在一起,表明基于ISSR标记对朱顶红品种进行遗传关系分析是可行的。

2.3 ISSR指纹图谱的构建

2.3.1 特异标记确定 上述实验结果表明:供试的62个朱顶红品种的ISSR-PCR扩增产物多态性很高,仅有1个品种有1条特异性条带,也仅有1个品种有1条特异缺失条带(图2)。在引物UBC873扩增图谱上,品种‘小红星’在450 bp处有1条特异性条带,此条带可用于品种‘小红星’的鉴定;在引物UBC835的扩增图谱上,品种‘精灵’在3 000 bp处有1条特异



1: 苹果花 Apple Blossom; 2: 橙色塞维 Orange Sovereign; 3: 维拉 Vera; 4: 简女士 Lady Jane; 5: 玛丽 Mary Lou; 6: 卡里美柔 Calimero; 7: 红孔雀 Red Peacock; 8: 哈库 Hercules; 9: 蒙特布朗 Mont Blanc; 10: 红狮 Red Lion; 11: 双迹 Double Record; 12: 萨德 Pasadena; 13: 安迪 Andes; 14: 女神 Aphrodite; 15: 当娜 Donau; 16: 帆船 Benfica; 17: 所罗门 Solomon; 18: 粉色精华 Pink Blossom; 19: 精灵 Elvas; 20: 花孔雀 Blossom Peacock; 21: 舞蹈皇后 Dancing Queen; 22: 凤蝶 Papilio; 23: 极品 Best Seller; 24: 雅典娜 Athene; 25: 贝贝星 Baby Star; 26: 波利舞曲 Bolero; 27: 小精灵 Fairytale; 35: 游戏 Faro; 36: 白孔雀 White Peacock; 37: 园艺师 Floris Hekkere; 38: 希望 Green Goddess; 39: 自由 Liberty Donker; 40: 耀眼的路德维格 Ludwig Dazzler; 41: 曼波乐曲 Mambo; 42: 奥拉夫 Olaf; 43: 奥林帕斯 Olympus; 44: 帕梅拉 Pamela; 45: 花边香石竹 Picotee; 46: 红里花边香石竹 Picotee Red Lining; 47: 鸡尾酒 Piquant; 48: 序曲 Prelude; 49: 约翰逊 President Johnson; 50: 承诺 Promise; 51: 快车 Rapido; 52: 罗马 Roma; 53: 桑河 San Remo; 54: 明星 Showmaster; 55: 苏珊 Susan; 56: 珍品 Unique; 57: 火焰孔雀 Flaming Peacock; 58: 小红星 Xiaohongxing; 59: 苏州 1 Suzhou 1; 60: 苏州 2 Suzhou 2; 61: 阿尔卑斯之角 Matterhorn; 62: 月光 Moonlight.

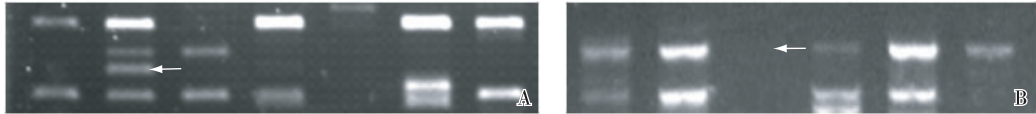
图 1 基于 ISSR 标记的 62 个朱顶红品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA cluster dendrogram of 62 cultivars of *Hippeastrum* spp. based on ISSR marker

缺失条带,这一缺失条带可用于品种‘精灵’的鉴定。
 2.3.2 指纹图谱构建 由于ISSR引物的多态性,采用同一引物扩增出的62个朱顶红品种的条带有明显差异。比对结果表明:利用引物UBC835可以鉴别出50个朱顶红品种,利用引物UBC873可以鉴别出44个朱顶红品种,而采用引物UBC835和UBC873组合

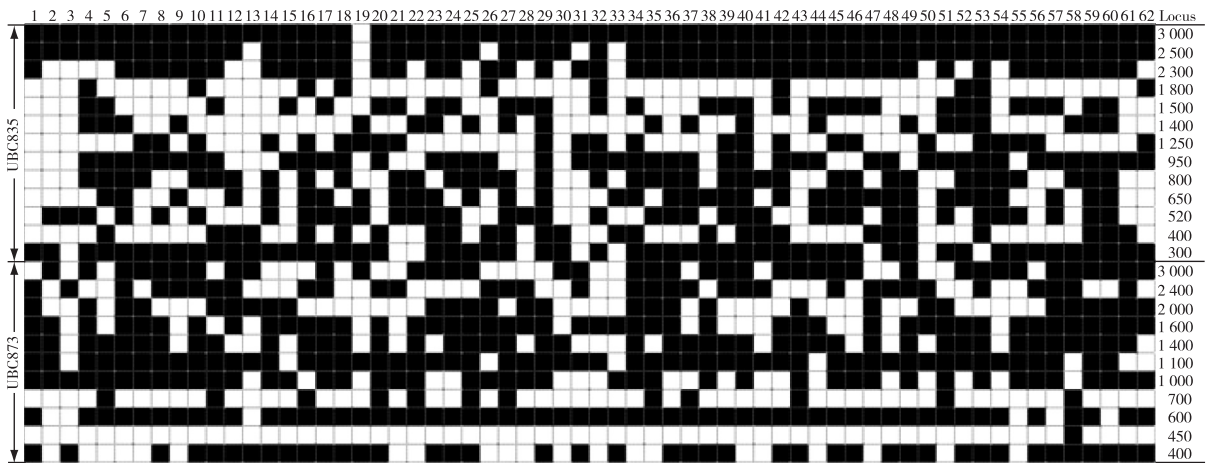
可以鉴别出供试的62个朱顶红品种。

对上述2个引物的扩增图谱进行形象化处理,在某一位点上有条带的用黑方块表示,无条带则用白方块表示,组合成供试62个品种的指纹图谱(图3),利用此指纹图谱,可以鉴定出使用特异性标记不能鉴别出的品种。



A: 由引物UBC873扩增获得的部分条带,箭头所示为品种‘小红星’的特异性条带 A part of bands amplified by primer UBC873, and arrow indicating a specific band of cultivar ‘Xiaohongxing’; B: 由引物UBC835扩增获得的部分条带,箭头所示为品种‘精灵’特异缺失的条带 A part of bands amplified by primer UBC835, and arrow indicating a specific missing band of cultivar ‘Elvas’.

图2 朱顶红品种‘小红星’和‘精灵’的ISSR标记特异谱带
 Fig. 2 Specific bands of ISSR marker for cultivars ‘Xiaohongxing’ and ‘Elvas’ of *Hippeastrum* spp.



1: 苹果花 Apple Blossom; 2: 橙色塞维 Orange Sovereign; 3: 维拉 Vera; 4: 简女士 Lady Jane; 5: 玛丽 Mary Lou; 6: 卡里美柔 Calimero; 7: 红孔雀 Red Peacock; 8: 哈库 Hercules; 9: 蒙特布朗 Mont Blanc; 10: 红狮 Red Lion; 11: 双迹 Double Record; 12: 萨德 Pasadena; 13: 安迪 Andes; 14: 女神 Aphrodite; 15: 当娜 Donau; 16: 帆船 Benfica; 17: 所罗门 Solomon; 18: 粉色精华 Pink Blossom; 19: 精灵 Elvas; 20: 花孔雀 Blossom Peacock; 21: 舞蹈皇后 Dancing Queen; 22: 凤蝶 Papilio; 23: 极品 Best Seller; 24: 雅典娜 Athene; 25: 贝贝星 Baby Star; 26: 波利舞曲 Bolero; 27: 卡门 Carmen; 28: 丁克 Celica; 29: 诱惑 Charisma; 30: 圣诞礼物 Charismas Gift; 31: 小丑 Clown; 32: 希望 Desire; 33: 俏皮玫瑰 Donau Rose; 34: 小精灵 Fairytale; 35: 游戏 Faro; 36: 白孔雀 White Peacock; 37: 园艺师 Floris Hekkere; 38: 希望 Green Goddess; 39: 自由 Liberty Donker; 40: 耀眼的路德维格 Ludwig Dazzler; 41: 曼波乐曲 Mambo; 42: 奥拉夫 Olaf; 43: 奥林帕斯 Olympus; 44: 帕梅拉 Pamela; 45: 花边香石竹 Picotee; 46: 红里花边香石竹 Picotee Red Lining; 47: 鸡尾酒 Piquant; 48: 序曲 Prelude; 49: 约翰逊 President Johnson; 50: 承诺 Promise; 51: 快车 Rapido; 52: 罗马 Roma; 53: 桑河 San Remo; 54: 明星 Showmaster; 55: 苏珊 Susan; 56: 珍品 Unique; 57: 火焰孔雀 Flaming Peacock; 58: 小红星 Xiaohongxing; 59: 苏州1 Suzhou 1; 60: 苏州2 Suzhou 2; 61: 阿尔卑斯之角 Matterhorn; 62: 月光 Moonlight.

图3 基于引物UBC835和UBC873扩增结果的62个朱顶红品种基因组DNA的ISSR指纹图谱

Fig. 3 ISSR fingerprint of genomic DNA of 62 cultivars of *Hippeastrum* spp. based on amplification result by primers UBC835 and UBC873

3 讨论

目前,关于朱顶红品种的遗传背景知之甚少。本研究结果显示:62个朱顶红品种的ISSR片段多态性较高,不同品种间遗传相似系数差异较大,说明在长

期的进化过程中,朱顶红品种在DNA分子水平上形成并保持了较高的变异,这可能与朱顶红某些品种存在自交不结实现象有关。朱顶红作为母本时的结实能力在一定程度上反映了该品种的园艺化程度,即越是原始的品种其结实能力越强,而经过多次杂交和人工繁殖的品种其结实能力减弱。吕文涛等^[14]对朱顶

红不同杂交和自交组合的研究结果表明:品种‘苹果花’和‘粉色精华’作为母本时不结实,说明它们是园艺化程度比较高的品种,在多次反复杂交过程中,作为母本它们的结实能力下降到几乎为零的水平;而品种‘贝贝星’、‘凤蝶’、‘橙色塞维’、‘红狮’、‘哈库’和‘所罗门’作为母本时在杂交和自交的情况下均可结实,说明这 6 个品种是相对比较原始的朱顶红品种。本研究结果表明:品种‘凤蝶’与其他 61 个品种的遗传相似系数平均值为 0.655 4,而园艺化程度较高的品种‘苹果花’为 0.606 9,说明品种‘凤蝶’在朱顶红的园艺化过程中发挥了重要作用。

从聚类分析结果看,供试的 62 个朱顶红品种没有完全按照花的单重瓣特性或花色聚类,而基本上是根据遗传相似系数混合聚成 7 组,但有许多形态极其相似的品种被聚在一起,表明基于 ISSR 标记对朱顶红品种进行遗传多样性分析是可行的。‘花边香石竹’、‘红里花边香石竹’和‘约翰逊’3 个品种形态特征完全一致,很难辨别,利用 ISSR 标记得到三者的两两遗传相似系数均为 0.814 3,在聚类图中聚在一起,与其形态特征具有一致性。花茎较高较粗的朱顶红品种‘蒙特布朗’和‘阿尔卑斯之角’以及花茎较细的朱顶红品种‘雅典娜’、‘圣诞礼物’和‘希望’的花型及其花色等特征完全一致,平均遗传相似系数分别为 0.742 9 和 0.785 7,在 62 个品种间处于较高的水平。分析结果表明:在供试的 62 个朱顶红品种中,白色单瓣品种中形态特征一致的品种均具有较高的遗传相似系数(约 0.8),表明它们具有一定的遗传相似性。因而,在实际引种时应避免引进形态类似的品种。另外,建议可将遗传相似系数作为新品种确定的依据之一,遗传相似系数大于一定数值的(如 0.8 以上)在确定新品种时应慎重。

在生产实践中应用的朱顶红栽培品种在园艺性状上具有一定的差别,通常根据花色、花型和株型等特征进行区分。但很多形态相似品种从外部形态特征上根本无法鉴别,不仅花色花型一致,而且受栽培条件影响较大,其花期和叶片数等特征也几乎无差别。本研究筛选出 2 个特异性条带可以分别鉴别品种‘小红星’和‘精灵’,而利用 2 个多态性高、重复性好的 ISSR 引物(UBC835 和 UBC873)构建的指纹图谱可以鉴别供试的 62 个品种。目前,运用 ISSR 标记

进行品种鉴定已具有极大的应用前景,但在实际运用过程中,应对朱顶红品种进行进一步的研究以期筛选出更多的特异性条带,特别是应注重形态相似品种间的特异性条带筛选,使这一鉴定方法的应用范围更大、鉴定结果更准确和快捷。

致谢: 苏州大学蚕丝生物技术实验室为本研究提供实验条件,谨此致谢!

参考文献:

- [1] BELL W D. New potentials in *Amaryllis* breeding[J]. Florida State Horticultural Society, 1973, 86: 462-466.
- [2] MEEROW A W, KANE M E, BROSCHEAT T K. Breeding of new *Hippeastrum* cultivars using diploid species: the F-1 evaluation[J]. Florida State Horticultural Society, 1990, 103: 168-170.
- [3] 张敏, 黄苏珍, 仇硕, 等. 鸚尾属植物遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 6-11.
- [4] 刘本英, 王丽鸳, 周健, 等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 458-464.
- [5] 李梅, 侯喜林, 单晓政, 等. 部分桂花品种亲缘关系及特有标记的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 674-682.
- [6] 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[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499-3510.
- [7] ZHAO W G, MIAO X X, ZANG B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of *Mulberry* cultivars in China by ISSR Markers[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(9): 851-860.
- [8] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1243-1248.
- [9] CHAKRABARTY D, GUPTA V N, DATTA S K. Varietal identification and assessment of genetic relationships in *Hippeastrum* using RAPD markers[J]. Plant Biotechnology Reports, 2007, 1: 211-217.
- [10] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [11] 巩振辉. 园艺植物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [12] CAMACHO F J, LISTON A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR)[J]. American Journal of Botany, 2001, 88(6): 1065-1070.
- [13] 吕英民, 王有江. 朱顶红[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 16-58.
- [14] 吕文涛, 成海钟, 周玉珍, 等. 朱顶红人工授粉的结实率与出苗率研究初报[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 185-187.

(责任编辑: 张明霞)