

小菊花色芽变品系的 SRAP 鉴定

秦贺兰¹, 曹靖², 姚士才¹, 张西西¹

(1. 北京市园林科学研究所 北京 100102 2. 山西农业大学 园艺学院 山西 太谷 030801)

摘要:利用 SRAP 技术进行小菊粉色花芽变与黄色花对照的 DNA 多态性分析。88 对引物共扩增出清晰条带 1 169 条, 分子量在 147~700 bp 之间。芽变品种及对照遗传相似系数为 0.997, 遗传物质多态性为 0.68%, 表明芽变与对照在遗传背景上高度的一致。筛选出 5 对引物, 获得 8 条可能与花色芽变基因有关的特异条带, 粉色花特有条带为 190.550 bp (Me4—Em10)、560 bp (Me5—Em1)、410 bp (Me6—Em7), 对照特有条带为 570.557 bp (Me4—Em11) 及 220.350 bp (Me6—Em5)。这些特异条带能够在植物生长早期鉴别芽变品种与对照。推测造成小菊粉色花芽变的原因很可能是染色体结构的变异。

关键词:小菊; 花色芽变; SRAP

中图分类号: S 682.1⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)02-0111-03

菊花是我国的“国花”。芽变是菊花新品种产生的重要来源。对芽变植物新品种(系)鉴定的现行方法主要是参照《中华人民共和国植物新品种 DUS 测试指南(试行稿)》进行的表现性状的测定和描述。近年来快速发展起来的 DNA 分子标记技术, 能够在植物生长早期将芽变品种与原始品种区别开来, 并能揭示芽变品种与原始品种的本质区别^[1-3]。该试验目的是采用稳定性较好、多态率较高的 SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) 分子标记技术^[4-6] 对选育的栽培小菊粉色花芽变品种及黄色花原始品种遗传物质进行分析比较, 以期从分子水平揭示花色芽变与原始品种的差异, 为芽变新品种的早期鉴定和新品种保护提供更加科学、快速的技术支持; 为小菊花色芽变基因的克隆、测序分析和揭示花色芽变的分子机理打下基础。

1 材料与方法

试验于 2008 年 2~6 月在北京市园林科学研究所进行。用改良 CTAB 法提取叶片 DNA, 于 -25℃ 冰箱中保存备用。SRAP 扩增反应体系为 20 μL: 10×PCR Buffer 3 μL; DNA 模板 2 μL (约 50 ng); 上、下游引物各 2 μL (引物由上海生工合成, 碱基序列略); dNTP (2.5 mM each) 2 μL; Taq DNA Polymerase (5 U/μL) 0.3 μL; dd H₂O 8.7 μL。扩增程序参照 Li 和 Quiros 的方法为: 94℃ 3 min, 94℃ 1 min, 37℃ 1 min, 72℃ 2 min, 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 5 min。扩增产物

用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶分离, 电泳恒定功率为 65 W, 电泳 2 h。凝胶采用银染法进行染色。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物的扩增结果和遗传相似性分析

88 对引物共扩增出清晰条带 1 169 条, 分子量在 147~700 bp 之间 (表 1)。每对引物组合可扩增的清晰条带数在 4~24 条之间, 平均为 13.3 条。特异条带数为 8 条。为进一步说明芽变与对照在遗传物质上的差异程度, 对 DNA 片段多态性进行了分析。采用 Nei & Li (1979) 的遗传相似系数 (Genetic Similarity, GS): $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, N_i 、 N_j 分别为样本 i 、 j 的带数, N_{ij} 表示公共带数, 遗传距离 $D = 1 - GS$; 多态性 (%) = 多态性片段数 / 总扩增片段数 × 100 = $(N_i + N_j - 2N_{ij}) / (N_i + N_j - N_{ij}) \times 100$ 。粉色芽变和原始品种共有条带为 1 161 条, 各有条带均为 1 165 条。数据结果表明, 粉色花芽变与对照遗传相似系数为 0.997, 遗传距离仅为 0.003, 遗传物质多态性为 0.68%, 表明芽变与对照在遗传背景上

表 1 芽变及对照 88 对引物 SRAP 扩增结果

引物	Me1	Me2	Me3	Me4	Me5	Me6	Me7	Me8
Em1	22	16	14	14	18(1)	27	7	6
Em2	24	12	21	11	16	18	11	7
Em3	20	19	14	14	17	12	4	5
Em4	19	15	12	11	16	19	15	8
Em5	22	14	13	13	13	24(2)	9	11
Em6	12	9	9	21	12	9	6	8
Em7	21	15	14	18	14	13(1)	8	14
Em8	5	12	8	12	11	10	1	8
Em9	16	19	9	15	19	15	8	18
Em10	10	12	14	13(2)	13	4	12	5
Em11	15	17	16	16(2)	14	17	9	11

注: () 内是观测发现的差异带数。

第一作者简介: 秦贺兰 (1971—), 女, 硕士, 高级工程师, 现从事花卉育种和栽培研究工作。E-mail: qinhe1an71@yahoo.com.cn。

基金项目: 北京市科委重大资助项目 (D0705003040121)。

收稿日期: 2009-09-20

高度的一致。据此推测,造成小菊粉色花芽变的原因很可能是因染色体异位、插入、缺失或突变而造成的染色体结构上的微小变异而非 DNA 片段拷贝数的增加^[7-8]。

2.2 特异片段的筛选和分析

88 对引物中 5 对引物组合: Me4—Em10、Me4—Em11、Me5—Em1、Me6—Em5、Me6—Em7 扩增结果具有多态性(图 1、2), 引物有效性 5.68%。粉色芽变品种

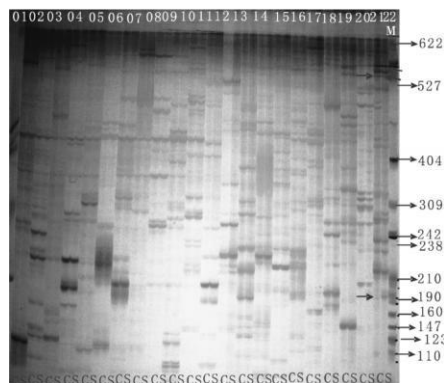


图1 粉色芽变和对照 22 对引物 SRAP 电泳图谱

注:01~11 引物对依次为 Me3—Em1、Me3—Em2、Me3—Em3、Me3—Em4、Me3—Em5、Me3—Em6、Me3—Em7、Me3—Em8、Me3—Em9、Me3—Em10、Me3—Em11; 12~22 引物依次为 Me4—Em1、Me4—Em2、Me4—Em3、Me4—Em4、Me4—Em5、Me4—Em6、Me4—Em7、Me4—Em8、Me4—Em9、Me4—Em10、Me4—Em11。M 为 Marker 左侧孔道 C 为对照 右侧孔道 S 为花色突变体 → 指示特异 DNA 片段。

在 Me4—Em10、Me5—Em1、Me6—Em7 扩增结果中, 分别在 190、550(图 1 中所示 21S 孔道)、560(图 2 所示 01S 孔道)、410 bp(图 2 所示 18S 孔道)处具有特异带, 对照品种缺失; 对照品种在 Me4—Em11、Me6—Em5 扩增结果中, 分别在 570、557(图 1 中所示 22C 孔道)、220 及 350 bp(图 2 所示 16C 孔道)处有特异带, 粉色芽变品种缺失(图 1、2 箭头指示)。这些特异条带, 推测可能包含着形成花色芽变的突变基因。

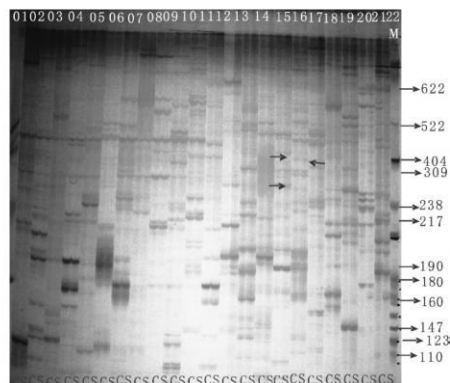


图2 粉色芽变和对照 22 对引物 SRAP 图谱

注:01~11 引物对依次为 Me5—Em1、Me5—Em2、Me5—Em3、Me5—Em4、Me5—Em5、Me5—Em6、Me5—Em7、Me5—Em8、Me5—Em9、Me5—Em10、Me5—Em11; 12~22 引物依次为 Me6—Em1、Me6—Em2、Me6—Em3、Me6—Em4、Me6—Em5、Me6—Em6、Me6—Em7、Me6—Em8、Me6—Em9、Me6—Em10、Me6—Em11。M 为 Marker, 左侧孔道 C 为对照, 右侧孔道 S 为花色突变体 → 指示特异 DNA 片段。

3 结论与讨论

作为芽变新品种鉴定的一种辅助手段, SRAP 技术是以叶片中提取的 DNA 为材料进行 DNA 水平的分析从而给出发生芽变的本质差异。借助此技术能够在植物生长早期而不必等到盛花期将花色芽变品种与原始品种鉴别开来。虽然如此, 花色芽变品种与对照在遗传物质组成上高度的一致(相似系数为 0.997), 相比之下, 遗传物质多态性变化位点仅占 0.68%, 造成花色芽变的基因可能仅在于庞大基因组 DNA 很小的位点上。通过对特异性片段的 DNA 克隆、测序和进一步分析, 很可能获得花色芽变机理的进展。

参考文献

- [1] 朱咏, 潘一山, 郑少缘. 龙柚芽变系的 RAPD 分析鉴定[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2008(2): 99—101.
- [2] 谢吉容, 梁国鲁, 李树发. 月季“金银岛”红花芽变品种的分析鉴

定[J]. 北方园艺, 2007(11): 186—188.

- [3] 申屠文月, 陈析丰, 马伯军. 3 个山茶花变异品种的形态鉴定和 RAPD 分析[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2006, 29(3): 317—321.
- [4] 张西西, 徐进, 王涛. 等. 万寿菊杂交一代遗传多态性的 SRAP 标记分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1221—1226.
- [5] Ferriol M, Pico B, de Cordova Fernandez P, et al. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker[J]. Crop Science, 2004, 44: 653—664.
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455—461.
- [7] 贾兵, 朱立武, 余兴. 等. 猕猴桃品种“皖翠”芽变位点的 SCAR 标记研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(2): 251—255.
- [8] Triiano R N, Scatt M C, Cactano G. Genetic signatures amplification profiles characterize DNA mutation in Somatic and radiation induced sports of chrysanthemum[J]. J. Amer Soc Hort Sci, 1998, 123: 642—646.

春兰杂交育种初探

王俊萍¹, 章丹峰²

(1. 杭州灵隐管理处(杭州花圃), 浙江 杭州 310007; 2. 杭州植物园, 浙江 杭州 310000)

摘要: 精选名品春兰进行种内杂交及自交人工辅助育种, 研究春兰遗传规律及蒴果生长过程。结果表明: 成果率与受精后栽培养护关系很大, 在受精后40 d左右幼果容易损失, 8~9月份是关键期, 兰株易染病, 容易导致蒴果夭折。

关键词: 春兰; 杂交育种; 杂交; 自交

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0113-03

传统的兰花繁殖方式是分株繁殖, 但通过观察发现野生兰花是靠种子繁殖的。长期以来人们选育春兰的优良品种主要是在野生春兰的自然变异株中选择。自然变异中的优良变异非常稀少, 且现在春兰野生资源已遭到了严重破坏, 仅靠从野生兰花里选育品种不能满足人们对新品种的需要, 因此迫切需要人为创育新品种。因春兰的名贵品种市场价位较高, 而在常规育种方法中, 人工辅助杂交育种方法的目的性强、成功率高、危害性小、最适合名贵春兰育种。2003年3月, 开展名贵春兰人工辅助杂交育种试验, 开始探索名品春兰的遗传规律, 并认真仔细地观察了春兰蒴果的整个生殖生长过程。

第一作者简介: 王俊萍(1971—), 女, 山东临邑人, 本科, 助理工程师, 现从事兰花栽培管理工作。E-mail: zdf1207@163.com.

收稿日期: 2009-08-20

1 材料与方法

1.1 杂交时机

按照杂交育种的一般要求, 精选生长健壮的父母本放于适宜的光温条件下, 并施入长效肥, 杂交最佳时期为花开后3 d上午10时左右。

1.2 操作方法

用镊子去掉父本的舌瓣, 取下花粉, 去掉花粉盖, 取出4个花粉块, 同时去掉母本的花粉块和舌瓣, 用镊子把父本花粉块放入母本合蕊柱下的柱头处(凹处), 柱头粘液就会粘住花粉块。一般一个柱头可用1~2块花粉块授粉, 如果父本充足, 则可多放几块, 以产生群体效应有利于授粉成功。授粉后不必套袋, 做好标签并记下杂交时间及父本名称。

1.3 种内杂交和自交

采用了5个杂交组合和4个自交品种进行试验。育种目标: 探索人工创育春兰新品种的方法, 期望杂交

SRAP Identification of Pink Flower Sport from Chrysanthemum with Small Flowers

QIN He-lan¹, CAO Jing², YAO Shi-cai¹, ZHANG Xi-xi¹

(1. Beijing Institute of Gardening and Landscape, Beijing 100102; 2. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: Polymorphic DNA was studied in pink flower sport from chrysanthemum with small flowers using SRAP. A total of 1 169 clear bands were amplified with 88 pair primer, the fragment length ranged from 147 bp to 700 bp. Genetic Similarity (GS) was 0.997, Genetic polymorphic was 0.68%, which showed high similarity in genetic between sport and control 5 pair primer amplified 8 distinctive bands, of which 190, 550 bp (Me4—Em10), 560 bp (Me5—Em1) and 410 bp (Me6—Em7) was present only in sport, otherwise 570 bp, 557 bp (Me4—Em11) and 220, 350 bp (Me6—Em5) was only in control. These distinctive polymorphic DNA segments could be associated with flower color sport and identified pink flower lines from control one in the earlier stage. The flower-color-sport reason was maybe change in DNA structure.

Key words: chrysanthemum with small flowers; flower-color-sport; SRAP identification