

# 十一份不同地理居群野菊的 ISSR 分析

周 杰, 陈俊愉

(北京林业大学 园林学院 北京 100083)

**摘 要:** 对 11 份野菊材料分别用 ISSR 分子标记和形态学特征进行了遗传分析。用 13 个引物共得到 176 个位点, 其中 166 个多态性位点, 多态性比率 (PPB) 高达 94.32%; 结果表明: 2 种分类方法得到的结果不甚一致。说明了野菊是一个多型性的种, 在形态上表现出体态、叶型、叶序、伞房花序式样以及茎叶毛被性等诸特征上的极大的多样性。从 ISSR 标记分析, 湖北神农架野菊和安徽天堂寨野菊之间的遗传系数最大, 为 0.727; 安徽天柱山野菊和南京野菊之间的遗传系数最小, 为 0.591。

**关键词:** 野菊; 地理居群; ISSR; 表型性状; 遗传距离

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0200-04

菊属植物 (*Chrysanthemum* spp.) 由于在分类上存在许多疑点而受到系统学家的关注。菊花的起源问题也

是至今为止国内外专家学者争论的焦点论题。现已初步肯定菊花是“栽培杂种复合体” (Hybrid cultigen complex)<sup>[12]</sup>。它是个高度远缘杂交起源的人工形成物种。其主要亲本为毛华菊 (*C. vestitum*)、野菊 (*C. indicum*) 与紫花野菊 (*C. zawadskii*) 等。经过长期天然杂交和人工选择发展而来<sup>[1-3]</sup>。野菊作为菊花起源中的重要种, 一直受到关注。其在自然界分布广泛, 我国东北、华北、华东、华中、华南及西南等各地均有<sup>[4]</sup>, 与毛华菊、甘菊均有共同分布区, 并发现天然杂种出现。目前对不同地理居

**第一作者简介:** 周杰 (1978-), 女, 博士, 研究方向为园林植物遗传育种。E-mail: zhoujie7861@163.com。

**通讯作者:** 陈俊愉 (1971-), 男, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 研究方向为园林植物遗传育种。E-mail: chenjunyu\_bj@163.com。

**收稿日期:** 2009-03-25

菊提前开花。

## 3 结论与讨论

使用植物生长调节剂赤霉素后, 对株高、叶片数、茎粗、叶绿素含量的提高都很大, 特别使用 50 mg/L 的浓度处理的效果最佳。对花朵、花鲜重、开花株数比例的正面影响也很大。但是, 使用浓度超过 75 mg/L 后, 植株高度、茎粗、叶绿素含量、花鲜重都会降低。所以, 合适浓度的赤霉素使用后, 将极大地提高非洲菊的花鲜重、高度、茎粗、叶绿素含量, 开花比例也有提高, 从而对非洲菊鲜切花的产量和质量产生较大的影响<sup>[3]</sup>。这与前人的研究一致<sup>[4]</sup>。综合植物生长调节剂赤霉素的表

现, 以浓度 50 mg/L 的处理为最佳。

赤霉素可以加速细胞分裂、伸长, 所以对植株高度、叶片数、茎粗、叶绿素含量、花朵大小有影响, 但是当浓度过大, 营养生长过旺, 对花头的大小和花鲜重有负向作用。

## 参考文献

- [1] 邵莉桐. 植物激素 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1986.
- [2] 潘瑞炽, 刘逸, 应成. 植物激素的作用机理 [J]. 植物生理生化进展, 1982(1): 20-23.
- [3] 黄定华. 花卉花期调控新技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [4] 李树发, 杨玉勇, 唐开学, 等. 云南出口切花月季花期调控技术 [J]. 云南农业科学, 2005(3): 13-14.

## The Influence of GA on the Quality of *Gerbera jamesonii*

LI Yun

(Biotechnology Institute of Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China)

**Abstract:** The *Gerbera jamesonii* (los) treated with different GA were Studied. The results showed that plant high, lamina number, stalk thick and chlorophyll content could be increased by treatment with GA. It also had the distinct effect on the quality of *Gerbera jamesonii*. 50 mg/L GA was a better method.

**Key words:** *Gerbera jamesonii*; GA; Growth; Quality

群野菊的结实性、核型<sup>[5]</sup>等都有一定的研究,但对不同地理居群野菊的遗传差异还不甚明了。该研究重点对分布在长江流域不同地区的野菊进行 DNA 分子鉴定以期探寻遗传规律,为菊花起源进一步寻找证据。

表 1 不同居群野菊表型性状观察测量结果

学名	拉丁名	来源	叶长/ cm	叶宽/ cm	叶柄/ cm	叶型 叶裂	花径	舌状花数	管状花数	花色	缩写编码
野菊	<i>C.indicum</i>	安徽黄山	4.9	3.4	1.1	羽状半裂	2.6	16	65	黄	Hin
		安徽天柱山	4.9	4.1	1.2	羽状半裂	2.6	23	117	黄	Tān
		安徽全椒	4.5	3.2	1.4	羽状深裂	2.1	17	80	黄	Qin
		南京	3.6	3.1	1.1	羽状半裂	2.2	18	95	黄	Nin
		湖北宜昌	5.2	4.9	1.8	羽状深裂	1.9	18	73	黄	Yān
		河南老君山	5.3	4.9	2.7	羽状深裂	1.9	20	76	黄	Lín
		陕西天竺山	4.3	3.2	0.9	羽状深裂	1.7	14	54	黄	Tān
		湖北神农架	5.2	2.9	1.5	羽状深裂	2.6	17	131	黄	Snin
		北京	3.6	3.4	0.9	羽状深裂	1.0	16	101	黄	Bin
		安徽天堂寨	7.7	3.9	0.9	羽状浅裂	1.4	22	69	黄	Tin
野菊变种	<i>Ch.indicum</i> cv.	安徽天堂寨	7.3	6.1	2.4	羽状半裂	3.1	22	78	黄	Incv

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的材料为 11 份不同地理分布的野菊 (*Chrysanthemum indicum*), 引种到北京林业大学梅菊圃中, 进行采样。

1.2 菊属植物总 DNA 的提取与检测

春季生长期旺盛之时采集亲本及其子代的幼嫩叶片, 用硅胶快速干燥后备用。每种植物采集 10 棵植株的叶样等量混合, 组成代表该植物种的试样。

用改良的 SDS 法提取菊属植物总 DNA<sup>[9]</sup>, 利用紫外分光光度计测定所提取的总 DNA 的含量和纯度, 同时采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳法检测提取的总 DNA 是否降解。

1.3 ISSR 反应条件及程序

ISSR-PCR 的基本条件: 20 μL PCR 反应体系, 1× Taq DNA 酶缓冲液 (10 mmol/ L Tris-HCl, 50 mmol/ L KCl, 0.1% Trion X-100, pH 9.0), 2.0 mmol/ L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/ L dNTPs, 40 ng 模板 DNA, 0.6 μmol/ L 引物, 1.0 U Taq DNA 聚合酶。

用 BIO-RAD 公司生产的 ALS1296 型 PCR 仪进行 DNA 扩增, 反应程序为 94℃充分变性 5 min; 94℃变性 45 s, 55 退火 40 s, 72℃延伸 70 s, 45 个循环; 最后 72℃延

伸 7 min; 4℃保存。

1.4 检测方法

取 9 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 缓冲液为 1× TAE, 电压为 5 V/ cm, 0.5 μg/ mL 核酸染色剂 Gold-view 染色。紫外光下自动凝胶成像系统观察拍照。

根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为 1, 无 DNA 条带的记为 0。用 NT.sys.PC 分析软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增结果

利用 2 个表型差异较大的材料对 60 条 ISSR 引物进行了筛选, 选择 20 条带型清晰、多态性较好的引物为 11 份不同地理分布的野菊 (*Chrysanthemum indicum*)。淘汰扩增效果差、带型不易辨认的引物, 最终确定 13 条引物用于研究 11 份材料的遗传多样性。共扩增出 176 条可统计的 ISSR 条带, 其中多态性带 166 条, 多态性比率 (PPB) 高达 94.32%, 扩增片断大小在 200 ~ 2 200 bp 之间。每个引物平均扩增条带数 9 ~ 20 条, 各引物扩增的条带数见表 2。各引物扩增反应的退火温度为 52 ~ 55℃。13 条引物扩增的效果均比较理想, 扩增的重复性很好, 凝胶电泳图谱清晰, 易于统计分析, 且多态性较高 (见图 2)。

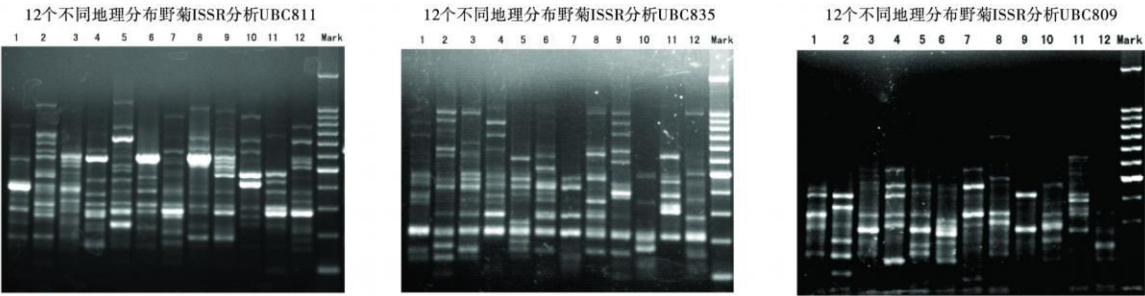


图 1 ISSR-PCR 反应效果

由表 2 可知, 菊属种间在分子水平的多态性是及其丰富的。图 1 为引物 809、811、835、扩增的结果。引物 835 最多扩增出 19 条多态性条带; 引物 808 最少只扩增出 7 条多态性条带。从电泳图上可以看出, 菊属 11 份材料的 ISSR 扩增产物电泳图的条带清晰, 多态性好, 显示出较好的遗传多样性。在 13 个引物中, 有 12 个二核苷酸重复序列, 一个三核苷酸重复序列, 表明菊属基因组中以二核苷酸重复居多, 与缪恒彬<sup>[6]</sup> 结果一致。

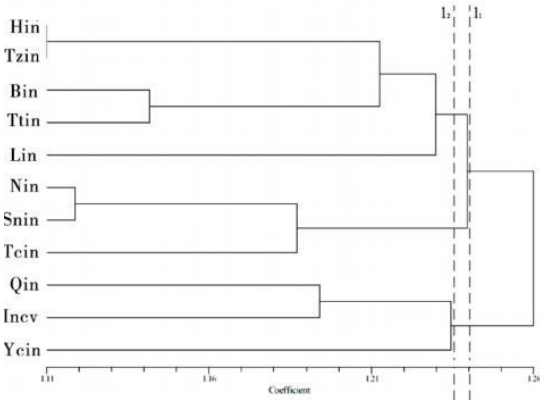


图 2 11 份野菊材料遗传多样性的 ISSR 进化树

2.2 野菊 12 份材料的 ISSR 聚类分析

ISSR 分析产生的 DNA 条带, 经统计分析后通过 UPGMA 法构建了菊属不同居群间的分子系统树(图 2)。从树状图中可以看出, 若以距离系数约  $L_i=1.24$  为分界线, 可以明显地将野菊 11 份材料分为 2 大类。第 1

类安徽黄山、安徽天柱山、北京、安徽天堂寨、河南老君山、南京、湖北神农架、陕西天竺山; 第 2 类为安徽全椒、安徽天堂寨变种、湖北宜昌。Inev 是首次在安徽天堂寨发现的一个植株, 其与当地的野菊形态变异很大, 生境周围没有发现野菊和毛华菊分布, 但株型类似毛华菊。且花径较一般野菊大。从 DNA 分子聚类来看, 也与当地野菊遗传距离较远, 因此建议将其作为 1 个新种。

表 2 用于 11 份材料遗传关系分析的 ISSR 引物及其扩增结果(Y 为嘧啶, R 为嘌呤)

引物	引物序列	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率/%
808	(AG) <sub>8</sub> C	9	7	77.8
809	(AG) <sub>8</sub> G	16	16	100
811	(GA) <sub>8</sub> C	16	16	100
818	(GA) <sub>8</sub> G	12	12	100
827	A(CA) <sub>7</sub> CG	11	10	90.9
834	(AG) <sub>8</sub> YT	12	11	91.7
835	(AG) <sub>8</sub> YC	20	19	95
844	(CT) <sub>8</sub> RC	9	9	100
845	(CT) <sub>8</sub> RG	14	13	92.9
855	(AC) <sub>8</sub> YT	13	12	92.3
857	(AC) <sub>8</sub> YG	12	11	91.7
ISSR1	CGC C(GA) <sub>6</sub>	17	17	100
ISSR2	(GAG) <sub>6</sub>	14	13	92.9
合计		176	166	94.32

注: R=A/ T, Y= C/G, H= A/ T/G, V= A/ G/C.

基于 ISSR 扩增所产生的 176 条 DNA 带, 获得了 11 份野菊材料的 Jaccard 遗传相似系数矩阵(表 3)。可以看出, 湖北神农架野菊和安徽天堂寨野菊之间的遗传系数最大, 为 0.727; 安徽天柱山野菊和南京野菊之间的遗传系数最小, 为 0.591; 计算得出平均遗传系数为 0.656。

表 3 基于 ISSR 多态性的 Jaccard 遗传相似系数

居群	Hin	Tzin	Qin	Nin	Ycin	Lin	Ttin	Snin	Bin	Ttin	Inev
Hin	1.0000000										
Tzin	0.7045455	1.0000000									
Qin	0.6761364	0.6193182	1.0000000								
Nin	0.6590909	0.5909091	0.6079545	1.0000000							
Ycin	0.6136364	0.5909091	0.6193182	0.6590909	1.0000000						
Lin	0.6875000	0.6306818	0.6590909	0.6761364	0.6193182	1.0000000					
Ttin	0.6647727	0.6306818	0.6477273	0.6647727	0.6079545	0.6590909	1.0000000				
Snin	0.6818182	0.6363636	0.6193182	0.7159091	0.6022727	0.6534091	0.7102273	1.0000000			
Bin	0.7102273	0.6306818	0.6477273	0.6875000	0.6306818	0.6704545	0.6704545	0.6761364	1.0000000		
Ttin	0.7045455	0.6363636	0.6306818	0.6477273	0.6250000	0.6988636	0.6420455	0.7272727	0.7215909	1.0000000	
Inev	0.6988636	0.6079545	0.6704545	0.6306818	0.6647727	0.6590909	0.6250000	0.6988636	0.6818182	0.6534091	1.0000000

2.3 表型性状观察与测定结果及分析

表型性状观察与测定结果见表 1。根据表 1 中各表型性状的测定结果, 将 11 份材料中的质量性状全部量化, 即羽状浅裂为 1, 羽状半裂为 2, 羽状深裂为 3; 黄色为 1, 紫红色为 2。将安徽的设为 1, 湖北的设为 2, 南京的设为 3, 南京的 4, 河南的 5, 北京的 6, 仪征的 7, 陕西的 8。将这些量化数据与花径、叶长等数量性状的数据用 SAS 软件进行聚类分析。分析结果由图 3 可以看出, 若以距离系数约  $L_i=0.105$  为分界线, 可以明显地将野菊

11 份材料分为两大类。第 1 类安徽黄山、湖北宜昌、安徽全椒、河南老君山、陕西天竺山、安徽天堂寨变种、安徽天堂寨、南京、北京、湖北神农架; 第 2 类为安徽天柱山。其与 ISSR 分析产生的 DNA 条带聚类结果有一定偏差, 这正与野菊是一个多型性的种, 有许多生态的、地理的或生态地理得居群, 表现出体态、叶型、叶序、伞房花序式样以及茎叶毛被性等诸特征上的极大的多样性<sup>[4]</sup> 相吻合。

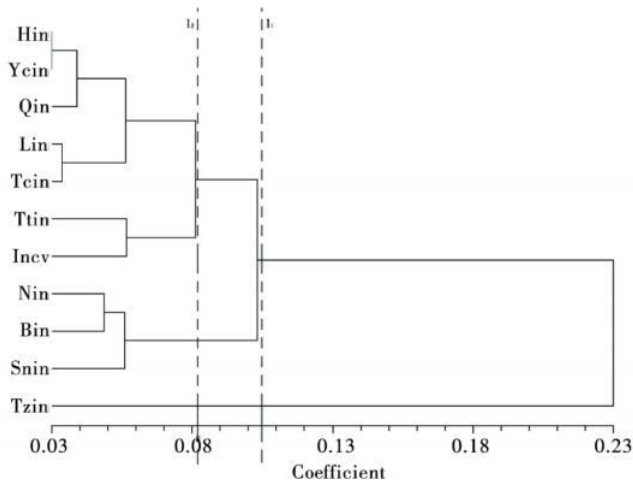


图 3 11 份野菊材料遗传多样性的表形性状进化树

3 讨论

试验研究表明, ISSR 技术在对菊属的遗传多样性研究中, 确定的 ISSR 反应体系具有稳定性和重复性。筛选出 13 个引物扩增位点, 具备分辨率高和多态性强的特点, 多态位点比率达 94.32%。

遗传多样性一般是指种内的遗传差异水平。它反映一个物种适应环境的能力及其被改造和利用的潜力<sup>[7]</sup>。

表型和分子分析的 UPGMA 聚类结果与自然地理

分布规律没有呈现一致性。不同地区基因交流不甚频繁, 群体间维持较高水平的遗传分化。表明不同的生境可以导致遗传结构的显著差异。所以在进行菊花起源的研究时, 对作为重要种的野菊材料的选择则尤为慎重。应选择较广泛的不同地理居群的能涵盖较多遗传信息的多群体样本数量作为研究对象, 才能较全面地代表野菊这个种的遗传信息。遗传距离系数与聚类分析表明, ISSR 分子标记技术可将 11 份野菊供试的全部材料区分开来, 同时也进一步阐明了野菊种质资源即使在同一省和同一地区分子水平都存在丰富的遗传变异与遗传多样性, 为 ISSR 技术用于构建菊属 DNA 指纹图谱奠定了良好基础。

参考文献

[ 1 ] 陈俊愉. 中国花卉品种分类学 [ M ]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 13-14.

[ 2 ] 李鸿渐. 菊花 [ C ] // 陈俊愉, 程绪珂. 中国花经. 上海: 上海文化出版社, 1990: 16-22.

[ 3 ] 龙雅宜. 园林植物栽培手册 [ M ]. 北京: 中国林业出版社, 2004.

[ 4 ] 林谔, 石铸. 中国植物志 [ M ]. 北京: 科学出版社, 1983: 28-45.

[ 5 ] 赵宏波, 陈发棣, 房伟民, 等. 不同地理居群野菊、毛华菊自交和开放条件下结实性研究 [ C ]. 中国菊花研究论文集 2002-2006: 212-215.

[ 6 ] 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊花起源的 RAPD 分析 [ J ]. 植物学报 1998, 40( 11 ): 1053.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] 马文辉, 何平. RAPD 标记在植物系统进化研究中的应用 [ J ]. 西南师范大学学报( 自然科学版 ), 1999( 5 ): 482-491.

Genetic Diversity Revealed by ISSR Marker in *Chrysanthemum indicum* of Different Geographical Distribution

ZHOU Jie, CHEN Jun-yu

(College of Landscape Architecture of Beijing Forestry University, Beijing 100083 China)

**Abstract:** The genetic relationship of 11 *Chrysanthemum indicum* was analyzed with ISSR markers and morphological traits. With 13 ISSR primers, 166 polymorphic loci were detected out of 176 loci in total. Results obtained from ISSR and morphological traits indicated that they exhibit the different tendency. It indicated that *Chrysanthemum indicum* has many different surfaces. It in difference of posture, phyllotaxy, inflorescence and so on. Cluster analysis showed that the GS value of Hubei Shen nongjia was 0.727. Anhui Tiantangzhai was 0.591 by ISSR marker.

**Key words:** *Chrysanthemum indicum*; Different geographical distribution; ISSR; Morphological trait; Genetic distance