

DOI:10.11937/bfyy.201510025

鸢尾属部分园艺品种遗传多样性的 ISSR 分析

童俊¹, 周媛¹, 毛静^{1,2}, 董艳芳^{1,2}, 徐冬云¹, 陈法志¹

(1. 武汉市林业果树科学研究所, 湖北省园林植物工程技术研究中心, 湖北 武汉 430075; 2. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要:以 34 份鸢尾属园艺品种为试材, 采用 ISSR 分子标记方法, 研究鸢尾属园艺品种的遗传特性及亲缘关系。结果表明: 10 个 ISSR 随机引物检测到 153 个多态位点, 多态性条带比例为 100%, 表明供试材料具有丰富的遗传多态性。各品种之间的 DICE 遗传相似系数在 0.148~0.657 之间, 平均相似系数为 0.365。由聚类分析可知, 当遗传系数为 0.354 时, 可将供试材料分为 4 个品种群。其中 I 群有 21 个品种, 全部为须毛状附属物亚属的德国鸢尾。II 群有 4 个品种, 包括无附属物亚属的西伯利亚鸢尾和 2 个花菖蒲品种。III 群有 4 个品种, 包括 2 个花菖蒲品种以及 2 个从荷兰引进的德国鸢尾。IV 群为无附属物亚属的路易斯安那鸢尾品种群。主坐标分析所反映的关系和 UPGMA 聚类图相似。

关键词:鸢尾品种; ISSR; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)10-0104-04

鸢尾属鸢尾科(Iridaceae)鸢尾属(*Iris* L.)植物, 世界著名宿根花卉, 花型多样, 花色艳丽, 花期较长, 叶片优美, 素有“宿根皇后”的美誉。鸢尾观花观叶的双重价值使其广泛用于园林绿化、庭院种植、湿地景观及切花等。鸢尾属是鸢尾科中最大的一个属, 全世界鸢尾野生种约 280 种, 我国约有 60 个种、13 个变种及 5 个变型^[1-2]。因受到数量与观赏性以及栽培特性等方面的制约, 鸢尾原种在世界各地园林中用于栽培观赏的却不多。目前, 在园林中广泛应用的是鸢尾园艺品种, 鸢尾园艺类群包括根茎类无髯鸢尾、根茎类有髯鸢尾和球根鸢尾。其中有髯鸢尾花型和花色最为丰富, 是欧美园林中最为盛行的一类鸢尾。而无髯鸢尾生态类型一般为湿生或中生型, 适应性相对较广, 随着现代育种工作的开展, 鸢尾品种也日渐丰富, 逐渐受到人们的青睐, 其中以西伯利亚鸢尾、路易斯安那鸢尾和花菖蒲等最为著名^[3-4]。

国内外一直在积极开展鸢尾属植物系统分类学、细胞发育学、繁殖生物学、分子生物学及植物化学等多方面的研究, 采用分子标记和序列分析等手段分析鸢尾属植物的系统发育学与种类亲缘关系也是现代鸢尾属植物研究的新焦点。牟少华等^[5]对我国鸢尾属植物的地理分布、种质资源保存状况及园林应用情况进行了概

述, 并提出了今后研究的 4 个主要方向。王瑞芬^[6]利用 SSR 和 SRAP 分子标记对新疆喜盐鸢尾居群遗传多样性进行了研究, 从 10 对 SSR 引物和 120 对 SRAP 引物中分别筛选出 6 对和 18 对引物对新疆喜盐鸢尾自然居群进行遗传多样性分析, 2 种标记技术对新疆野生喜盐鸢尾自然居群的遗传多样性的分析具有较高的一致性。张敏等^[7]利用 ISSR 分子标记对鸢尾属国内分布的 25 个野生鸢尾种(变型、变种和居群)和 6 个国外分布种的 37 份材料进行了遗传分析, 多态性比例达 99.7%, 说明鸢尾属物种间有丰富的遗传多样性。利用 15 个有效引物可以较好地将鸢尾属供试 37 份材料分为 6 组, 其中矮紫苞鸢尾和单苞鸢尾单独划为一组。随着鸢尾类植物的园艺品种的增多, 其遗传背景愈发复杂。但目前尚鲜见对鸢尾园艺品种进行遗传多样性的研究报道。

ISSR 技术由于多态性好, 稳定重复性好, 操作简便, 广泛运用于遗传多样性、遗传稳定性和遗传分化及亲缘关系等方面的研究, 在多种植物中已见报道^[8-10]。为了有效区分鸢尾不同品种类型, 深入了解其遗传背景, 该试验利用 ISSR 分子标记对该课题组所收集的德国鸢尾、路易斯安那鸢尾、西伯利亚鸢尾和花菖蒲的一些栽培品种开展多样性评价及亲缘关系的分析, 以期对鸢尾属植物的遗传改良和种质创新工作提供科学指导和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试鸢尾属植物材料共 34 份(表 1), 主要是从北京

第一作者简介:童俊(1980-), 女, 湖北黄冈人, 硕士, 工程师, 现主要从事园林植物遗传育种与栽培技术等研究工作。E-mail: vivian7484@126.com

基金项目:武汉市晨光计划资助项目(201271031407)。

收稿日期:2015-01-22

植物研究所、南京、上海、以及荷兰等地引进的鸢尾属植物品种,包括德国鸢尾、路易斯安那鸢尾、西伯利亚鸢

尾、花菖蒲的一些栽培品种,所有品种种植于武汉市林业果树科研所武湖科技园鸢尾资源圃内。

表 1

34 份鸢尾属材料名称

Table 1

The 34 *Iris* L. materials and their origins

编号 Code	材料名称 Material name	拉丁名 Latin name	编号 Code	材料名称 Material name	拉丁名 Latin name
1	德国鸢尾‘黑骑士’	<i>Iris germanica</i> ‘Black knight’	18	德国鸢尾‘不朽白’	<i>I. germanica</i> ‘Immortality’
2	德国鸢尾‘金娃娃’	<i>I. germanica</i> ‘Gold boy’	19	德国鸢尾‘魂断蓝桥’	<i>I. germanica</i> ‘Blue Staccato’
3	德国鸢尾‘皇家十字军’	<i>I. germanica</i> ‘Royal Crusades’	20	德国鸢尾‘守夜者’	<i>I. germanica</i> ‘Night Ruler’
4	德国鸢尾‘洋娃娃’	<i>I. germanica</i> ‘Dolly’	21	德国鸢尾‘血石’	<i>I. germanica</i> ‘Bloodstone’
5	德国鸢尾‘黄连’	<i>I. germanica</i> ‘Zipper’	22	德国鸢尾‘Gala Madrid’	<i>I. germanica</i> ‘Gala Madrid’
6	德国鸢尾‘紫边白’	<i>I. germanica</i> ‘Stitch Witch’	23	德国鸢尾‘Nibelungen’	<i>I. germanica</i> ‘Nibelunge’
7	德国鸢尾‘音箱’	<i>I. germanica</i> ‘Music Box’	24	西伯利亚鸢尾‘堇四褶’	<i>I. sibirica</i> ‘Fourfold Lavendel’
8	德国鸢尾‘笛声’	<i>I. germanica</i> ‘Tantara’	25	西伯利亚‘红光’	<i>I. sibirica</i> ‘Sparkling Rose’
9	德国鸢尾‘短梦’	<i>I. germanica</i> ‘Little Dream’	26	路易斯安那 1 号	<i>I. louisiana</i> ‘No. 1’
10	德国鸢尾‘杰西之歌’	<i>I. germanica</i> ‘Jesse’s Song’	27	路易斯安那 2 号	<i>I. louisiana</i> ‘No. 2’
11	德国鸢尾‘Liny Charm’	<i>I. germanica</i> ‘Liny Charm’	28	路易斯安那 3 号	<i>I. louisiana</i> ‘No. 3’
12	德国鸢尾‘Queen’	<i>I. germanica</i> ‘Queen’	29	路易斯安那 4 号	<i>I. louisiana</i> ‘No. 4’
13	德国鸢尾‘White’	<i>I. germanica</i> ‘White’	30	路易斯安那 5 号	<i>I. louisiana</i> ‘No. 5’
14	德国鸢尾	<i>I. germanica</i>	31	花菖蒲 1 号	<i>I. ensata</i> ‘No. 1’
15	德国鸢尾‘Party dress’	<i>I. germanica</i> ‘Party dress’	32	花菖蒲 2 号	<i>I. ensata</i> ‘No. 2’
16	德国鸢尾‘法国回声’	<i>I. germanica</i> ‘Echo de France’	33	花菖蒲 3 号	<i>I. ensata</i> ‘No. 3’
17	德国鸢尾‘蓝瀑布’	<i>I. germanica</i> ‘Blue waterfall’	34	花菖蒲 4 号	<i>I. ensata</i> ‘No. 4’

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良 CTAB 法提取叶片基因组总 DNA^[11]。总 DNA 经 RaseA 酶解纯化后,用等体积的氯仿和异戊醇(体积比为 24:1)混合液抽提。用无水乙醇沉淀后溶于 TE,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的分子质量并根据荧光强度确定 DNA 浓度,将 DNA 浓度调到 20 ng/ μ L 待用。

1.2.2 ISSR 检测 选取叶片纤维发达程度不同的鸢尾材料 4 份(德国鸢尾‘黑骑士’、西伯利亚‘红光’、路易斯安那 1 号、花菖蒲 1 号),从 38 个 ISSR 随机引物(英骏生物技术有限公司合成)中筛选出条带清晰、多态性高、重复性好且稳定性强的引物 10 个。在对鸢尾属植物 ISSR 分析及 PCR 扩增体系优化后,确定反应总体积为 20 μ L,其中 TaqDNA 聚合酶(Thermo scientific 公司)1 U、10 \times PCR Buffer 2 μ L、1.5 mmol/L 的氯化镁、0.2 mmol/L dNTP、0.5 μ mol/L 引物、20 ng 模板 DNA,其余用蒸馏水补充。PCR 扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min;梯度降温进行复性,7 个循环后稳定,在 53 $^{\circ}$ C 复性,进行 39 个循环,循环结束后,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳检测,85 V 电压,电泳 100 min,溴化乙锭染色后在凝胶成像仪上观察并照相记录。

1.3 数据分析

PCR 扩增产物的电泳位置在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带记为 1,无 DNA 条带记为 0。利用 NTSYS-PC 软件计算种质间 DICE 遗传相似系数,采用 SHAN 程序中的 UPGMA 法进行聚类分析,构建聚类图。采用 DCENTER 程序对相似系数矩阵进行转换,再用 EIGEN 程序进行主坐标分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增多态性分析

由表 2 可知,10 个 ISSR 随机引物在供试材料中共扩增出 153 条带,全部条带均为多态性条带,多态性条带比例为 100%,说明供试鸢尾属材料之间具有丰富的遗传多态性。各引物扩增的 DNA 带数在 12~18 条之间,平均每个引物扩增条带数和检测的 ISSR 多态性的平均数均为 15.3,说明供试鸢尾属植物间的异质性较高,遗传基础差异较大。部分引物扩增出的基因组 DNA 指纹图谱见图 1。

表 2 10 个 ISSR 有效引物序列及
对 34 份鸢尾属材料扩增结果

Table 2 The sequences of 10 primers and
the results of amplification on the 34 *Iris* L. materials

引物 Primer	序列 Sequence	总位点数 Number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性条带比例 Polymorphic proportion /%
N11	5'-(AG) ₈ YC-3'	17	17	100
N13	5'-(AG) ₈ YT-3'	17	17	100
N16	5'-(AG) ₈ RA-3'	13	13	100
N21	5'-(GA) ₈ YC-3'	17	17	100
N22	5'-(GA) ₈ YA-3'	12	12	100
N32	5'-(AC) ₈ RG-3'	15	15	100
N40	5'-(GACA) ₄ -3'	12	12	100
N41	5'-(GTGC) ₄ -3'	18	18	100
N45	5'-(CCT) ₅ -3'	16	16	100
N46	5'-(GGGGT) ₃ -3'	16	16	100
总计 Total		153	153	
平均 Average		15.3	15.3	100

注:Y:C/T;R:A/G。

Note:Y:C/T;R:A/G。

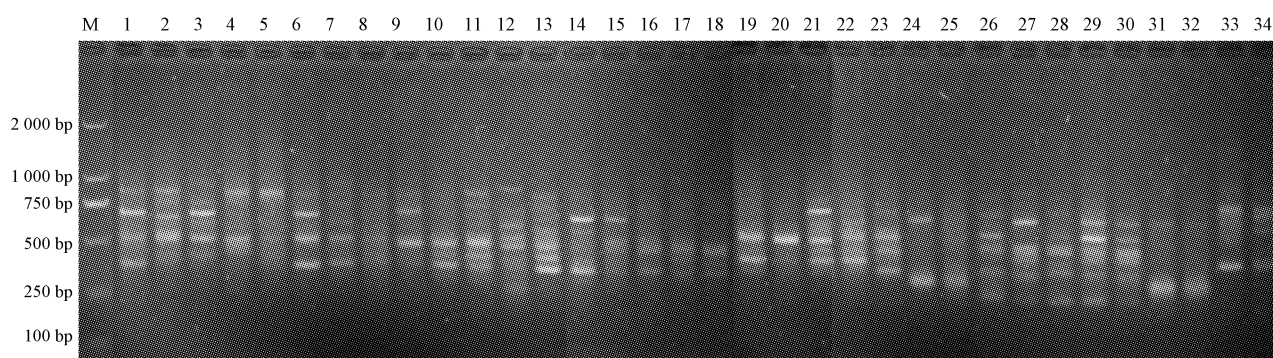


图1 34份鸢尾属材料在引物 N32 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results with ISSR primer N32 of 34 *Iris* L.

34 份鸢尾种质的 DICE 相似系数介于 0.148~0.657 之间,平均相似系数为 0.365。其中,德国鸢尾‘White’和路易斯安那 5 号的相似系数最小为 0.148,表明二者亲缘关系最远,前者为有髯鸢尾,后者为无髯鸢尾。而德国鸢尾‘蓝瀑布’和‘不朽白’的相似系数最大为 0.657,表明这 2 个品种亲缘关系最近,遗传相似程度最高。

2.2 UPGMA 聚类分析

用 NTSYS-PC 软件对 34 份鸢尾种质资源进行聚类分析并构建出分子系统树(图 2),从聚类图上可以反映出物种间亲缘关系的远近。为了便于分析,在聚类图的遗传距离 0.354 处划结合线,将供试鸢尾属的 34 份材料划分为 4 个品种群。其中 I 群有 21 个品种,全部为须毛

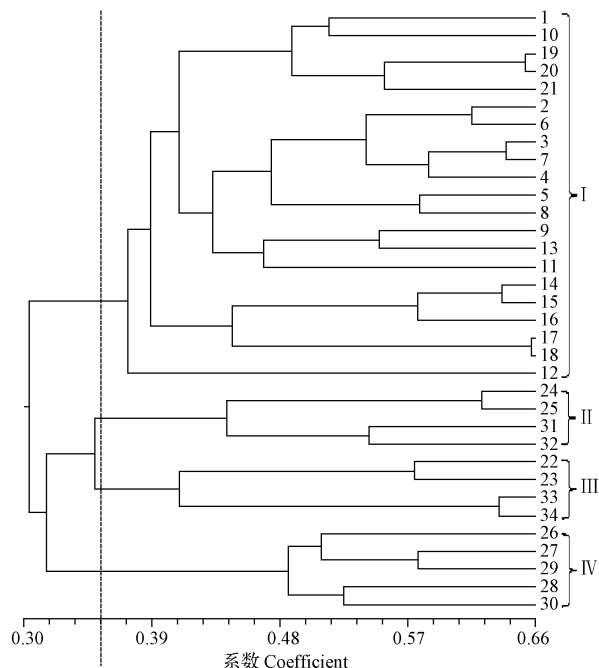


图2 34份鸢尾属材料基于 ISSR 标记的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 The UPGMA dendrogram of 34 *Iris* L. materials based on ISSR markers

状附属物亚属的德国鸢尾。II 群有 4 个品种,包括无附属物亚属的西伯利亚鸢尾和 2 个花菖蒲品种。III 群有 4 个品种,包括 2 个花菖蒲品种以及 2 个从荷兰引进的德国鸢尾。IV 群有 5 个品种,全部为无附属物亚属的路易斯安那鸢尾。

2.3 主坐标分析

进一步进行主坐标分析发现,在横坐标轴-0.02 处将图 3 分为二部分,德国鸢尾中的 21 个品种位于图右边(对应图 2 的 I 群),其中矮生德国鸢尾品种分布在右下部,中高生德国鸢尾品种分布在右上部。路易斯安那鸢尾集中分布在左下部(对应图 2 的 IV 群),西伯利亚鸢尾、花菖蒲以及 2 个从荷兰引进的德国鸢尾‘Gala Madrid’和‘Nibelungen’分布在左上部(对应图 2 的 II 群和 III 群)。德国鸢尾‘Gala Madrid’和‘Nibelungen’(22 和 23 号品种)位于图左上方中间位置,在图 2 中与花菖蒲品种群聚到了一起。主坐标二维图所反映的关系和 UPGMA 聚类图的相似。

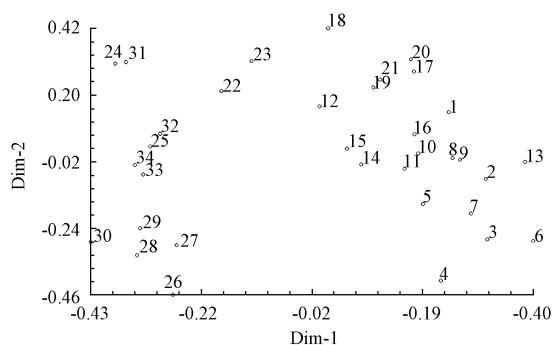


图3 34份鸢尾属材料基于 ISSR 标记的主坐标二维图

Fig. 3 The principal coordinates two-dimensional diagram of 34 *Iris* L. materials based on ISSR markers

3 结论与讨论

10 个有效引物共检测到 153 个位点且全部为多态位点,多态性条带比例为 100%。ISSR 分子标记本身具有多态性高的特点,该结果与张敏等^[7]利用 ISSR 分子

标记对德国鸢尾种内部分的栽培品种间进行了遗传分析检测得到的多态性位点百分率(99.7%)相当,也进一步证实了供试鸢尾种质资源具有较高的遗传多样性。

依据 10 个有效引物所产生的 153 个 ISSR 标记所建立的鸢尾 34 个品种 UPGMA 聚类图,将供试鸢尾属的 34 份材料划分为 4 个品种群,基本将该试验的 34 份材料分为德国鸢尾、路易斯安那鸢尾、西伯利亚鸢尾、花菖蒲四大类。其中,4 个花菖蒲品种分别聚到了 2 个不同的品种群,追溯花菖蒲的发展史可知,花菖蒲是先由中国传到日本,1681 年以后日本对野生花菖蒲进行了选育,确立了江户、肥后、伊势 3 个品种群,1852 年传到欧洲,经过美国改良,以后又回到日本,现在大概有 600 个品种,分析供试材料的 4 个花菖蒲品种可能来源于不同的花菖蒲品种群^[12]。德国鸢尾的栽培品种遗传背景复杂,现在栽培的德国鸢尾至少是有 10 个以上亲本的园艺杂种^[2]。该试验中德国鸢尾‘Gala Madrid’和‘Nibelungen’没有与其它 21 个德国鸢尾品种聚到一起,表明这 2 个荷兰引进的德国鸢尾较供试材料中其它德国鸢尾遗传背景差异较大。它们与 2 个花菖蒲品种聚到一起,推测可能花菖蒲参与了这 2 个德国鸢尾的形成。

34 份材料的平均相似系数为 0.365。其中,德国鸢尾‘White’和路易斯安那 5 号的相似系数最小,表明二者亲缘关系最远。而德国鸢尾‘蓝瀑布’和‘不朽白’的相似系数最大,表明这 2 个品种亲缘关系最近。德国鸢尾‘蓝瀑布’和‘不朽白’均为须毛状附属物亚属的德国鸢尾的栽培品种,都属于中晚花期高生有髯鸢尾,且二者形态相似,分析二者可能有相同起源。

遗传多样性和种质间亲缘关系的研究,不仅与种质资源的收集、保存和更新密切相关,而且是种质资源创新和品种改良的基础。物种的遗传多样性程度是物种

长期进化的产物,物种遗传多样性越高,表明种质资源在 DNA 分子水平存在差异越大,对环境变化的适应能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新的环境,可供进一步选择、保存和利用的空间就越大。改善品种综合性状的有效途径是增大育种亲本的遗传距离和多样性水平。由此,该研究利用 ISSR 分子标记的方法,在分子水平揭示所收集的鸢尾属种质资源的亲缘关系后,结合形态特征和园艺特性,就可以进一步在遗传多样性高的群体筛选和保留种质,为进一步新品种选育提供优质的亲本材料,提高保存和利用种质的效率。

参考文献

- [1] 赵毓棠. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1985:133-197.
- [2] 赵毓棠. 鸢尾欣赏与栽培利用[M]. 北京:金盾出版社,2005.
- [3] 胡永红,肖月娥. 湿生鸢尾——品种赏析、栽培及应用[M]. 北京:科学出版社,2012.
- [4] 郭晋燕,张金政,孙国峰,等. 根茎鸢尾园艺学研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(5):1149-1156.
- [5] 牟少华,鄧光发,彭镇华,等. 我国鸢尾属植物种质资源的研究与利用[J]. 草业科学,2007,24(8):21-25.
- [6] 王瑞芬. 利用 SSR 和 SRAP 分子标记对新疆喜盐鸢尾居群遗传多样性的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.
- [7] 张敏,黄苏珍. 鸢尾属种质资源的 ISSR 分析[J]. 南京农业大学学报,2008,31(4):43-48.
- [8] 廖芳蕾,陈民管,桑丹,等. 佛手种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2013,40(11):2222-2228.
- [9] 叶要妹. 利用 RAPD 和 ISSR 分析百日草自交系间的种质遗传多样性[J]. 中南林业科技大学学报,2008,28(4):36-41.
- [10] 宋明,刘婷,汤青林,等. 芥菜种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2009,36(6):835-842.
- [11] 李承哲,刘占林,杨红超,等. 改良 CTAB 法提取鸢尾属植物 DNA[J]. 现代农业科技,2011(8):31,34.
- [12] 肖月娥,胡永红. 花菖蒲品种分类与种质资源概况[J]. 现代园林,2013,10(8):33-35.

Genetic Diversity Analysis of *Iris* L. Germplasm by ISSR

TONG Jun¹, ZHOU Yuan¹, MAO Jing^{1,2}, DONG Yan-fang^{1,2}, XU Dong-yun¹, CHEN Fa-zhi¹

(1. Wuhan Forestry and Fruit-tree Research Institute, Hubei Engineering Technology Research Center of Landscape Plant, Wuhan, Hubei 430075; 2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) was used to detect the genetic diversity among 34 horticultural cultivars of *Iris*. The results showed that 10 primers produce 153 clear, polymorphic and steady bands. All of bands were polymorphic (100%), which indicated that the genetic diversity of *Iris* L. was rich. The genetic similarity coefficient among the accessions ranged from 0.148 to 0.657, and the average was 0.365. At the point of the similarity coefficient 0.354, all the accessions might be separated into four groups. The group I consisted by the cultivars of *I. germanica*. The group II had two cultivars of *I. sibirica* and two of *I. ensata*. In group III, two *I. ensata* and two of *I. germanica* from Holland were included. The IV group was made up with cultivars of *I. Louisiana*. The results of principal coordinates showed similarity to the UPGMA dendrogram.

Keywords: *Iris* cultivars; ISSR; genetic diversity; relationship