

红掌品种亲缘关系 SRAP 分析

王呈丹^{1,2}, 牛俊海², 张志群², 潘宏兵², 任羽²

(¹海南大学农学院,海口 570100;²中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/
农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室,儋州 571737)

摘要:利用相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记,从100对引物组合中筛选出26对多态性高、条带清晰的SRAP引物,对33个红掌品种进行遗传多样性和亲缘关系分析。结果如下:(1)26对引物共扩增出366条带,其中有314条多态性条带,多态性比率为85.79%。引物组合产生的条带数在9~23之间,平均每对引物组合扩增出14.1条和12.1条多态性条带。(2)根据SRAP扩增结果,利用UPGMA法进行聚类分析,33份材料的遗传相似系数在0.55~0.94之间,在遗传相似系数0.786处可将33个红掌品种分为5个类群。结果表明,供试品种遗传多样性丰富,本研究为品种鉴定和杂交育种提供了参考信息。

关键词:红掌;SRAP;遗传多样性;聚类分析

Analysis of Genetic Relationships of *Anthurium andraeanum* Varieties Using SRAP Markers

WANG Cheng-dan^{1,2}, NIU Jun-hai², ZHANG Zhi-qun², PAN Hong-bing², REN Yu²

(¹College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570100; ²South China Key Lab of Agriculture Crop Genetic Resources and Germplasm Created/Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture, Danzhou 671737)

Abstract: Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis was carried out to evaluate the genetic diversity and genetic relationships among 33 *Anthurium andraeanum* cultivars. Out of 100 pairs of primers screened twenty-six pairs of SRAP primers were used to analyze genetic diversity of the tested materials. The results showed that: (1) Twenty-six primer pairs amplified out 366 bands, out of which 314 bands were polymorphic bands, the percentage of polymorphic bands was 85.79%. The number of bands ranged from 9 to 23 with an average of 14.1 bands and 12.1 polymorphic bands per primer. (2) According to the SRAP amplification results, the genetic similarity coefficient among tested cultivars was in a range from 0.55 to 0.94, a dendrogram produced using unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), and 33 *Anthurium andraeanum* cultivars were divided into five groups when genetic similarity coefficient was given as 0.786. The *Anthurium* cultivars showed a high genetic diversity, and the results would facilitate variety identification and cross breeding.

Key words: *Anthurium andraeanum*; SRAP; genetic diversity; cluster analysis

红掌(*Anthurium andraeanum*)为天南星科花烛属植物,是多年附生性常绿草本花卉,原产于中南美洲的热带和亚热带雨林地区^[1]。大部分红掌品种以切花、盆栽花卉以及观赏植物进行生产

和交易,在全球市场中已成为仅次于兰花的热带切花商品^[2]。长期以来对红掌的研究大多在栽培^[3-4]、病虫害防治^[5]、组培^[6-7]等方面,而在红掌遗传背景上的研究则相对甚少。红掌的遗传背

收稿日期:2012-09-02 修回日期:2012-11-01 网络出版日期:2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1738.004.html>

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD45B06);海南省重大科技研发专项(2009YFZX007);海南省科技成果示范推广专项(CGTG20100004)

第一作者研究方向为红掌种质资源评价。E-mail: evrin@163.com

通信作者:任羽,博士,主要从事石斛种质资源研究。E-mail: ry-hn@yahoo.com.cn

景复杂,亲缘关系不明确,给育种工作造成了一定的难度,本试验利用 SRAP 分子标记进行聚类分析,分析主要栽培品种间亲缘关系的远近,从而对红掌育种和品种改良具有重要的指导意义。

SRAP 是基于 PCR 的新型分子标记,反映的是内含子的间隔及启动子长度的多态性,具有重复性好、多态性高、在基因组中分布均匀、操作简单、引物具有通用性等优点。自建立以来,SRAP 分子标记已广泛用于遗传图谱构建、种质资源的鉴定评价、作物遗传多样性分析与系统发育分析、重要性状基因标记定位与克隆、品种指纹图谱绘制分析以及比较基因组学等方面^[8-10]。孟鹤^[11]证明了 SRAP 分子标记可以用于红掌的遗传多样性和亲缘关系分析。本研究利用 SRAP 分子标记对若干红掌品种之间的亲缘关系进行分析,旨在了解红掌的遗传背景,为红掌新品种的开发和选育、品种鉴定、甄别进口苗品种的真实性等提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 33 个红掌品种来自于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所种质资源圃(表 1)。

表 2 试验所用 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers used in this study

上游引物 Forward primers	引物序列(5'→3') Sequences of primers(5'→3')	下游引物 Reverse primers	引物序列(5'→3') Sequences of primers(5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em9	GACTGCGTACGAATTGAT
Me10	TGAGTCCAAACCGGCAT	Em10	GACTGCGTACGAATTCAG

扩增反应采用 25 μ L 的反应体系,其中包括: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 20 ng/ μ L 模板 DNA 2.5 μ L, 25 mmol/L Mg^{2+} 1.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 3.0 μ L, 10 μ mmol/L 正反引物各 3.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 双蒸水补充至 25 μ L。

表 1 供试红掌材料

Table 1 *Anthurium andreaenum* materials used in this study

编号 No.	品种名称 Varieties	编号 No.	品种名称 Varieties
1	情迷 Sharade	18	绿箭 Manaka
2	阿拉巴马 Alabama	19	欢呼 Cheers
3	紫公主 Rapido	20	辛巴 Simpra
4	粉冠军 Pink Champion	21	热情 Tropical
5	甜梦 Sweet dream	22	咖啡 coffee
6	新粉冠军 New Pink Champion	23	卫城 Acropolis
7	粉公主 Stallis	24	朝霞 ZhaoXia
8	维他 Vitara	25	彩霞 CaiXia
9	红塔 Fiesta	26	阿利桑那 Arizona
10	阿蒙特 Altimo	27	大哥大 Dakota
11	祝福 Impreza	28	米多蕊 Midori
12	红冠军 Red champion	29	神秘 Mystique
13	白冠军 White Champion	30	特伦萨 Turenza
14	樱桃红 Cherry	31	马都拉 Madura
15	北京成功 Beijing Success	32	爱美 Amis
16	阿拉伯 Arab	33	大哥大 B Dakota B
17	骄阳 Sierra		

大哥大 B 是在大哥大群体中发现的 2 株开橙花的品种

Two Dakota B varieties which open orange flower are found in the Dakota group

1.2 DNA 提取

改良 CTAB 法提取红掌 DNA^[12]。

1.3 SRAP-PCR 分析

引物序列(表 2)参照 G. Li 等^[13]和 Z. D. Sun 等^[14],由生物工程(上海)有限公司合成,从 100 对引物组合中筛选出 26 对扩增条带清晰、重复性好且多态性丰富的引物组合,对样品进行正式扩增。

PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

SRAP-PCR 扩增产物采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶

电泳分析,缓冲液为 $1 \times$ TBE。参照 C. J. Sanguinetti 等^[15]的方法对凝胶进行银染,并且拍照记录。

1.4 数据分析

用 100 bp DNA ladder 做分子量标准(Marker),统计电泳图清晰、可重复的条带,按凝胶同一位置上 DNA 条带的有无进行统计,有带记为 1,无带记为 0,形成 0/1 矩阵。通过 NTSYSpc(2.10e)软件计算遗传相似系数,用 SHAN 程序,按照 UPGMA 法进行聚类分析,并绘制出聚类分析图^[16]。

2 结果与分析

2.1 引物多态性分析

用筛选出的 26 对引物对供试的 33 个品种的

DNA 进行扩增,扩增结果见表 3。26 对引物组合共扩增出 366 条带,其中 314 条为多态性条带,多态性比率为 85.79%。引物组合产生的条带数在 9~23 之间,每对引物组合扩增条带数平均为 14.1 和多态性条带数平均为 12.1,说明了 SRAP 分子标记具有较好的多态效率,同时也很好地揭示了 33 个红掌品种间具有丰富的遗传多样性。引物组合 Me5-Em6、Me8-Em4、Me9-Em2、Me10-Em4 产生的多态性比率为 100%。产生条带和多态性条带数最多的引物组合是 Me10-Em8,多态性比率最低的引物组合是 Me5-Em7,仅为 60%。扩增产物的条带分布在 100~600 bp 之间(图 1)。

表 3 SRAP 引物组合扩增红掌 DNA 的多态性条带

Table 3 The numbers of polymorphic bands amplified by SRAP primers

引物组合 Primer pairs	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态比率(%) Rate of polymorphic band	引物组合 Primer pairs	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态比率(%) Rate of polymorphic band
Me1-Em10	9	7	77.78	Me8-Em9	12	11	91.67
Me5-Em2	19	16	84.21	Me8-Em10	12	8	66.67
Me5-Em3	12	10	83.33	Me9-Em2	12	12	100.00
Me5-Em6	10	10	100.00	Me9-Em6	12	9	75.00
Me5-Em7	15	9	60.00	Me9-Em8	21	18	85.71
Me5-Em8	11	9	81.81	Me9-Em10	13	12	92.31
Me6-Em4	13	12	92.31	Me10-Em2	10	8	80.00
Me6-Em10	16	15	93.75	Me10-Em3	11	8	72.73
Me7-Em4	16	15	93.75	Me10-Em4	16	16	100.00
Me7-Em9	19	16	84.21	Me10-Em6	17	11	64.71
Me8-Em3	12	11	91.67	Me10-Em7	15	11	73.33
Me8-Em4	10	10	100.00	Me10-Em8	23	22	95.65
Me8-Em7	17	16	94.12	Mean	14.1	12.1	
Me8-Em8	13	12	92.31	Total	366	314	85.79

2.2 聚类分析

基于 SRAP 的扩增结果,用 UPGMA 聚类分析方法绘制出聚类分析图(图 2)。结果显示遗传相似系数在 0.55~0.94 之间。其中粉冠军和新粉冠军的遗传相似系数最大,为 0.94,其次是红塔和樱桃红,遗传相似系数接近 0.928。亲缘关系最远的是粉冠军和绿箭,遗传相似系数最小,为 0.55。

由图 2 可以看出,在遗传相似系数 0.55 处,所有供试材料被聚为一类,在相似系数 0.786 处可将 33 个红掌品种分为 5 个类群(表 4),其中第 I、II

类群各包含 1 个品种,分别为绿箭、紫公主。

其中第 III 类群包括甜梦、红塔、阿蒙特、祝福、樱桃红、阿拉伯、欢呼、辛巴、热情、咖啡、卫城、彩霞、大哥大、米多蕊、神秘 15 个品种。在遗传相似系数 0.804 处被划分为 2 个亚类,即 III₁ 和 III₂。III₁ 亚类包括甜梦、祝福、阿蒙特、辛巴、阿拉伯、彩霞、卫城、大哥大、神秘 9 个品种,除卫城外都为红色花,且都为盆栽花卉;III₂ 亚类包括红塔、樱桃红、欢呼、热情、咖啡、米多蕊 6 个品种,后 4 个品种为切花品种,红塔和樱桃红是盆花品种,二者先聚类后再与 4 个

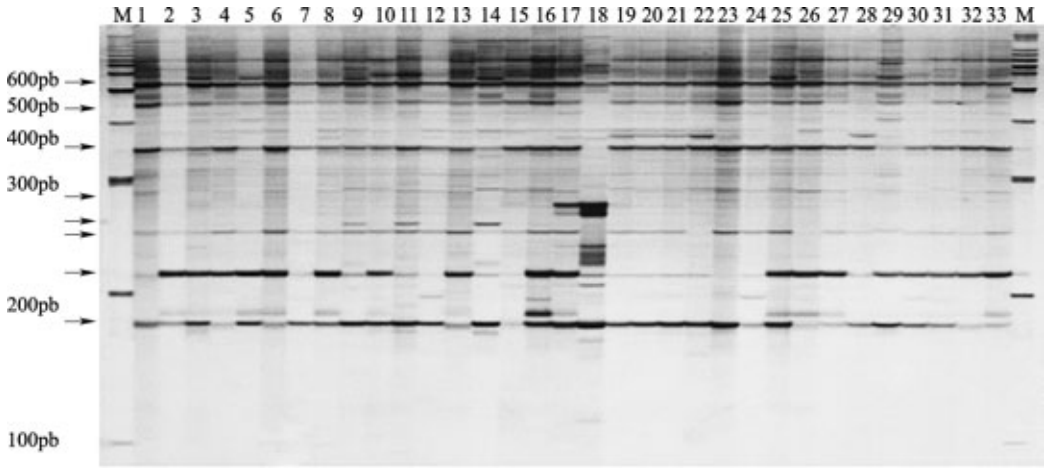


图 1 33 个红掌品种的 Me7-Em4 扩增产物 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 PCR products of 33 *Anthurium andraeanum* varieties with the primer pair Me7 and Em4 on 6% polyacrylamide gel

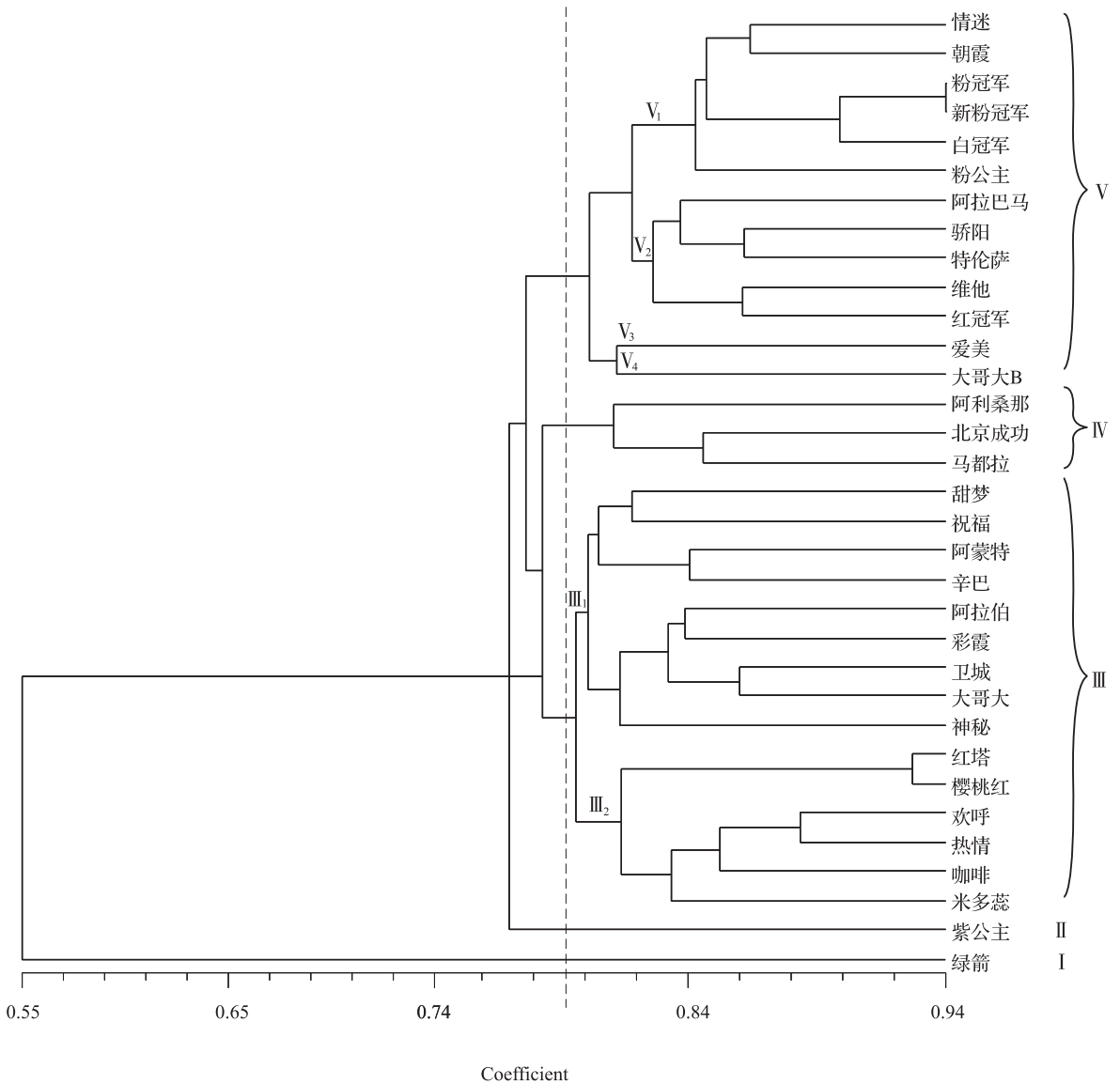


图 2 33 份红掌种质间的 SRAP 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 33 *Anthurium andraeanum* germplasm based on SRAP system

切花品种聚类,具体原因还有待进一步研究。

第Ⅳ类群包括北京成功、阿利桑那、马都拉 3 个品种。北京成功、马都拉在遗传相似系数 0.845 处聚类后再与阿利桑那聚类,佛焰苞均为红色,肉穗花序颜色都为黄色且直立,且佛焰苞形态、宽度相似。

第Ⅴ类群包括情迷、阿拉巴马、粉冠军、新粉冠军、粉公主、维他、红冠军、白冠军、骄阳、朝霞、特伦萨、爱美、大哥大 B 13 个品种。在遗传相似系数 0.824 处被划分为 4 个亚类,其中, V₁ 亚类包括情迷、朝霞、粉冠军、新粉冠军、白冠军、粉公主 6 个品种,植株高度一致,叶片形状为阔披针形、颜色相同都为深绿;除白冠军外其余 5 个品种的佛焰苞颜色均为深粉;白冠军是单株优选品种,与粉冠军及新粉冠军的佛焰苞形态相似。V₂ 亚类包括阿拉巴马、骄阳、特伦萨、维他、红冠军 5 个品种,佛焰苞颜色都为红色;V₃、V₄ 亚类各仅有 1 个品种分别为爱美和大哥大 B。

3 讨论

目前,对红掌遗传背景的研究主要集中在遗传多样性和亲缘关系的研究。D. G. Ranamukhaarachchi 等^[17]、P. Nowbuth 等^[18]以及 Y. Jeshima Khan 等^[19]都先后利用 RAPD 分子标记分别对一些盆栽品种、红掌切花品种进行了亲缘关系研究。本研究利用 SRAP 分子标记对 33 个红掌品种进行亲缘关系分析,发现品种间的聚类与佛焰苞的颜色和形态有关,这与 P. Nowbuth 等^[18]的研究结果相悖,但与 Y. Jeshima Khan 等^[19]的研究结果一致。

从聚类结果来看,33 个红掌品种在聚类分析图中的位置与叶片形态、叶片颜色、佛焰苞颜色、佛焰苞大小和植株高度有关。从图 2 可以看出粉冠军和新粉冠军亲缘关系最近,佛焰苞颜色和大小、叶片颜色和大小以及植株的高度都极为相似,因而推测粉冠军和新粉冠军可能是商业运作造成的 2 个不同品种,实质为同一品种。大哥大 B 是在大哥大群体中发现的 2 株开橙花的品种,其与大哥大的遗传相似系数为 0.857,表明二者之间存在遗传差异;而从遗传学角度来说,一个植物群体中发生单株变异的概率很低,而出现 2 株相同变异的品种概率更低,因此猜测大哥大 B 品种并非大哥大变异品种而是其他品种混入大哥大群体中的可能性较大,有待进一步鉴定。

目前,我国尚未建立红掌的核心种质,对具有优良性状的亲本资源的背景资料掌握得较少。本研究在 33 份红掌资源上获得的 SRAP 分子标记资料将有助于获知红掌品种间的亲缘关系,准确鉴定红掌的品种,在新品种的选育和保护育种工作者的权益等方面具有重要的意义。

参考文献

- [1] 李枝林,郑丽. 红掌研究综述[J]. 云南农业大学学报,1997,12(2):143-146
- [2] Galinsky R, Laws N. *Anthurium* market[R]. RAP Market Information Bulletin,1996:11
- [3] 单芹丽,赵辉,邓君浪,等. 红掌的栽培与管理技术[J]. 北方园艺,2003(2):38-39
- [4] 陈春满,郑贵朝,张善信,等. 不同栽培基质对红掌组培苗移栽成活及生长发育的影响[J]. 广东农业科学,2008(2):28-29
- [5] 蒋桂枝. 红掌栽培细菌性病害及其防治方法[J]. 农业与技术,2004,24(6):116-117
- [6] 兰芹英,仇玉萍,张运祥,等. 不同红掌品种的叶片、叶柄和茎段愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 西北植物学报,2003,23(6):1006-1009
- [7] 姜雷,梁彩虹,张志胜,等. 影响红掌愈伤组织诱导、增殖和芽分化的因素[J]. 种子,2006,25(11):26-30
- [8] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等. 新型分子标记—SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. 遗传,2004,26(5):777-781
- [9] 李莉,彭建营,白瑞霞,等. SRAP 与 TRAP 标记及其在园艺植物研究中的应用[J]. 西北植物学报,2006,26(8):1749-1752
- [10] 张安世,邢智峰,刘永英,等. SRAP 分子标记及其应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2562-2563
- [11] 孟鹤. 花烛属亲缘关系分析与细菌性枯萎病的检测[D]. 北京:中国农业科学院,2011
- [12] 朱佳文. 红掌人工诱变与遗传学分析[D]. 长沙:湖南农业大学,2005
- [13] 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]. Theor Appl Genet, 2001,103:455-461
- [14] Sun Z D, Wang Z N, Tu J X, et al. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers [J]. Theor Appl Genet, 2007,114:1305-1317
- [15] Sanguinetti C J, DiasNeto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994,17:915-919
- [16] 刘龙洲,翟文强,陈亚丽,等. 设施用厚皮甜瓜品种 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(3):381-385
- [17] Ranamukhaarachchi D G, Henny R J, Guy C L, et al. DNA fingerprinting to identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their genetic relationships [J]. Horticulture, 2001,36:758-760
- [18] Nowbuth P, Khitto G, Bahorun T, et al. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD markers [J]. African Biotechnol, 2005,4(10):1189-1194
- [19] Jeshima Khan Y, Pankajaksan M. Genetic diversity among commercial varieties of *Anthurium andraeanum* Linden using RAPD markers [J]. Plant Genetics & Transgenics, 2010,1(1):11-15