

# 云南大花香水月季居群遗传多样性的 SSR 分析

邱显钦<sup>1,2</sup> 唐开学<sup>1</sup> 蹇洪英<sup>1</sup> 王其刚<sup>1</sup> 李树发<sup>1</sup> 邵珠华<sup>1</sup> 张 颢<sup>1,2</sup>

1. 云南省农业科学院花卉研究所/云南省花卉育种重点实验室/

云南花卉技术工程研究中心, 昆明 650205;

2. 华中农业大学园艺林学学院/教育部园艺植物生物学重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 利用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记技术对云南省分布的8个大花香水月季天然居群遗传性进行了分析,结果表明:所选用的12对SSR引物,共扩增出72个位点,其中多态性位点70个,占总条带数的97.22%;在物种水平上,总居群的Nei's基因多样性指数( $H_e$ )和香农指数( $I$ )分别为0.3012和0.4600,说明云南地区大花香水月季居群的遗传多样性较高;大花香水月季居群内遗传变异(69.49%)大于居群间遗传变异(30.51%),说明居群内变异是其居群的主要变异来源;利用Popgene计算出两两居群间的Nei's遗传一致度( $I$ )和遗传距离( $D$ ),其范围分别为0.7615~0.9348和0.0674~0.2724,再依据遗传距离进行聚类分析,结果表明居群遗传距离与地理位置无显著的相关性。

**关键词** 大花香水月季; 遗传多样性; 简单重复序列(SSR)

**中图分类号** S 685.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0300-05

大花香水月季(*Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* Rehd. et Wils.)的花径长8~10 cm,是所有蔷薇属野生种中开花最大者,故又称巨花蔷薇,为云南省特有种<sup>[1-2]</sup>。大花香水月季具有花大、芳香、耐低温等优良性状,在云南省的分布范围以滇中为中心,滇南和滇西也有分布<sup>[2]</sup>。大花香水月季为香水月季原始类型,是月季演化的重要种源,也是培育大花品种和大型植株月季的重要种质资源<sup>[1-2]</sup>,对其进行深入研究具有十分重要的意义。

分子标记在蔷薇属遗传资源研究中的应用主要有三方面,一是在遗传多样性及分类方面的应用;二是在品种鉴定方面的应用<sup>[3]</sup>;三是在遗传图谱构建及基因定位方面的应用<sup>[4]</sup>。SSR标记技术与RAPD、RFLP等标记比较,具有数量丰富、多态性高、呈共显性、程序简单、耗时短、结果重复性好等优点<sup>[5-6]</sup>,SSR标记已在蔷薇属植物品种鉴定和遗传亲缘关系等研究领域得到了广泛应用<sup>[4]</sup>。

关于大花香水月季居群的研究仅有表型多样性分析的研究报道<sup>[7]</sup>,而遗传多样性的DNA分析未见报道。本研究应用SSR分子标记技术,对分布于

滇中和滇南地区的8个大花香水月季居群的遗传多样性进行分析,可为拓宽现代月季远缘杂交育种亲本的遗传基础提供重要的科学依据,同时也为野生种群的资源保护和保存、引种驯化以及开发利用等提供基础资料和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

遵循种群生态学的原理和方法<sup>[8]</sup>,选取8个大花香水月季天然居群(表1),每个居群选取15株生长状况良好的植株,采摘其健康幼嫩叶片,用硅胶干燥处理,于-20℃冰箱保存。

### 1.2 SSR分析

1)基因组DNA的提取。基因组DNA提取方法参照CTAB法<sup>[9]</sup>。

2)SSR引物。从荷兰瓦格林根大学引进12对月季SSR引物(表2),由Tiangen公司合成。

3)PCR扩增。PCR反应体系总体积为10 μL,其中1.2 μL的25 mmol 10×buffer,1.2 μL的2.5 mmol dNTPs,0.8 μL的25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>,0.5 μL

收稿日期: 2011-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660117)、国家“863”计划子课题项目(2006AA100109)、国家科技支撑计划子课题项目(2006BAD01A1805)、公益性行业(农业)科研专项(200903020)及云南省科技创新强省计划项目(2007C0003Z)

邱显钦,博士研究生,研究方向:月季分子抗性育种。E-mail: xianqin711@hotmail.com

通讯作者: 张 颢,研究员,研究方向:月季遗传育种。E-mail: zhanghao7898@sina.com

表 1 大花香水月季采样居群原产地的地理因子<sup>1)</sup>

Table 1 The geography factors of populations of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea*

居群 Population	北纬 North latitude	东经 East longitude	海拔/m Altitude
SHB	25°11'25"	102°48'32"	2 119
TJX	25°06'06"	102°31'14"	2 263
XS	25°11'05"	102°56'04"	2 076
SL	25°01'23"	103°21'21"	1 841
FM	25°15'55"	102°26'07"	2 200
LZC	23°18'44"	103°32'50"	1 610
HT	24°18'12"	102°25'30"	2 100
MPS	23°57'50"	101°57'05"	1 980

1) SHB: 松花坝(昆明) Songhuaba(Kunming); TJX: 团结乡(昆明) Tuanjieshiang(Kunming); XS: 小哨(昆明) Xiaoshao(Kunming); SL: 石林(昆明) Shilin(Kunming); FM: 富民(昆明) Fuming(Kunming); LZC: 老芷村(蒙自) Laozhicun(Mengzi); HT: 火特(玉溪) Huote(Yuxi); MPS: 磨盘山(玉溪) Mopanshan(Yuxi); 下同 The same as below.

的 10 μmol/L primer F, 0.5 μL 的 10 μmol/L primer R, 0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 80 ng DNA 模板。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C DNA 变性 45 s, 退火温度 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物的电泳和染色方法参照文献[4]。

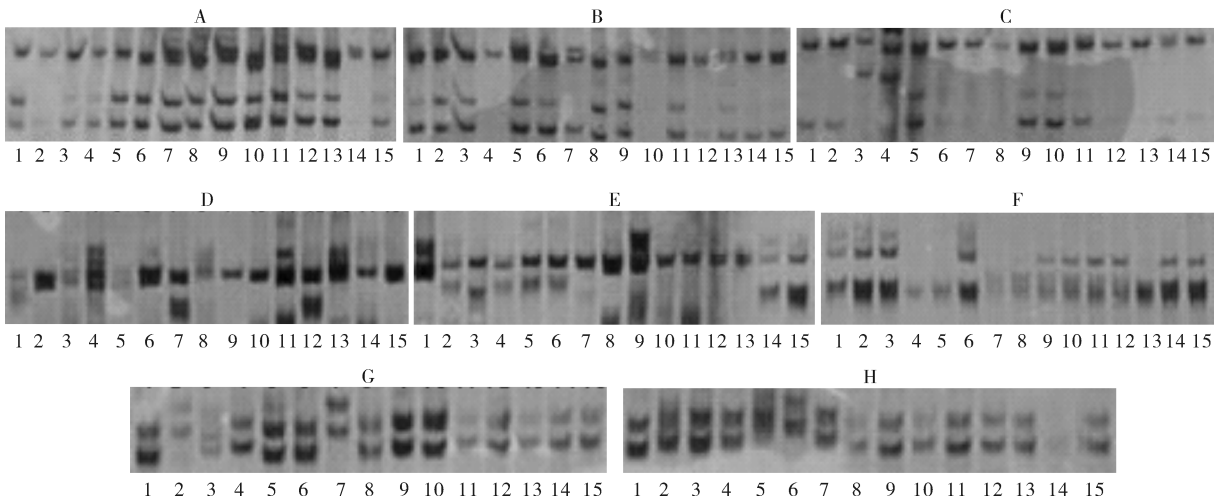
### 1.3 数据分析

基于电泳迁移率相等的条带是相同 DNA 片段扩增产物的假设, 将电泳结果中稳定出现的条带(无论强弱)的有或无量化为 1 和 0 进行人工读取并统计, 形成 0, 1 矩阵, 进而做成 Popgene 软件所需的格式。应用 Popgene 1.32 软件<sup>[10]</sup> 进行分析, 统计下列参数: 多态位点百分率(percentage of polymorphic loci, PPL)、香农指数(*I*)、Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )、总的基因多样性( $H_t$ )、居群内的基因多样性( $H_s$ )、平均每个位点的观察等位基因数( $N_a$ )、平均每个位点的有效等位基因数( $N_e$ )、遗传分化系数( $G_{st}$ )、基因流强度( $N_m$ )即居群间每一个世代迁移的个体数。据 Popgene 计算得到的 Nei's 遗传距离(*D*)和遗传一致度(*I*)进行聚类, 分析各居群之间的遗传关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 的扩增结果

利用 12 对引进的 SSR 引物对 8 个居群 120 个个体基因组进行 PCR 扩增, 共扩增出 72 条比较清晰的谱带, 平均每对引物扩增出 6 个位点, 其中多态性位点 70 个, 多态性条带百分率高达 97.22% (图 1, 表 2)。



1~15 为每个居群的样品编号 1-15; The numbers of samples from different populations; A, B, C: 分别为引物 RhO517 对富民(FM)、老芷村(LZC)、松花坝(SHB)居群样本的 PCR 扩增产物 The results of PCR amplification with RhO517 primers in FM, LZC and SHB populations; D, E, F: 分别为引物 RhAB13 对火特(HT)、磨盘山(MPS)、石林(SL)居群样本的 PCR 扩增产物 The results of PCR amplification with RhAB13 primers in HT, MPS and SL populations; G, H: 分别为引物 RhE3 对团结乡(TJX)、小哨(XS)居群样本的 PCR 扩增产物 The results of PCR amplification with RhE3 primers in TJX and XS populations.

图 1 SSR 引物对居群样本的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 The results of PCR amplification with SSR primers in populations

表 2 12 对 SSR 引物的扩增结果

Table 2 12 SSR primers selected and their amplification results

引物 Primers	总带数 Total site	多态性位点数 Numbers polymorphic loci	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic sites
RhO517	5	5	100.00
RhP519	6	6	100.00
RhM405	5	5	100.00
RhP507	7	7	100.00
RhAB40	9	8	88.89
RhP518	4	4	100.00
RhAB13	6	6	100.00
RhAB26	5	5	100.00
RhB19	7	6	85.71
RhBK4	5	5	100.00
RhD206	7	7	100.00
RhE3	6	6	100.00
合计 Total	72	70	
平均 Mean	6	5.83	97.22

## 2.2 居群遗传多样性分析

应用 Popgene 1.32 软件<sup>[10]</sup> 对大花香水月季 8 个居群的遗传多样性进行统计分析,结果如表 3 所示。在物种水平上,总的多态位点数为 92 个,多态位点百分率为 97.87%,Nei's 基因多样性指数为

0.301 2 ± 0.158 1, 香农指数为 0.460 0 ± 0.199 2。在居群水平上,8 个居群的平均多态位点百分率为 58.64%, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.209 3 ± 0.198 1, 平均香农指数为 0.312 8 ± 0.281 4。在 8 个居群中,各居群间的遗传多样性差别不大,各居群的遗传变异由高到低依次为 SL 居群 > FM 居群 > TJX 居群 > SHB 居群 > LZC 居群 > XH 居群 > HT 居群 > MPS 居群,其中 SL 居群的遗传多样性水平最高,MPS 居群的遗传多样性水平最低。

## 2.3 居群遗传结构分析

通过对大花香水月季 8 个自然居群的结构分析,其总的基因多样性( $H_t$ )为 0.301 2 ± 0.025 0, 居群内的基因多样性( $H_s$ )为 0.209 3 ± 0.010 6, 居群间的遗传分化系数( $G_{st}$ )为 0.305 1。这表明在物种水平上,有 30.51% 的遗传变异存在于居群间,69.49% 的遗传变异存在于居群内,居群内的遗传分化大于居群间的遗传分化,居群内变异是其居群的主要变异来源。居群间的基因流( $N_m$ )为 1.139 1, 表明居群间基因流较强。

表 3 8 个大花香水月季居群的遗传多样性分析<sup>1)</sup>Table 3 The genetic diversity among 8 populations of *R. odorata* var. *gigantea* Rehd. et Wils

居群 Population	NPL	PPL/%	$N_a$	$N_e$	$H_e$	$I$
SHB	60	63.83	1.638 3 ± 0.483 1	1.374 1 ± 0.368 4	0.221 2 ± 0.195 3	0.333 0 ± 0.278 1
TJX	61	64.89	1.648 9 ± 0.479 9	1.397 4 ± 0.374 0	0.232 9 ± 0.197 5	0.348 2 ± 0.281 0
XS	53	56.38	1.563 8 ± 0.498 6	1.294 7 ± 0.331 7	0.181 5 ± 0.184 5	0.278 4 ± 0.268 7
SL	70	74.47	1.744 7 ± 0.438 4	1.447 7 ± 0.373 2	0.261 2 ± 0.191 1	0.391 5 ± 0.266 0
FM	65	69.15	1.691 5 ± 0.464 4	1.396 3 ± 0.371 3	0.233 9 ± 0.192 6	0.353 4 ± 0.270 9
LZC	55	58.51	1.585 1 ± 0.495 3	1.386 5 ± 0.389 9	0.221 9 ± 0.206 9	0.327 8 ± 0.294 9
HT	42	44.68	1.446 8 ± 0.499 8	1.339 5 ± 0.422 5	0.184 9 ± 0.221 0	0.266 8 ± 0.311 9
MPS	35	37.23	1.372 3 ± 0.486 0	1.239 4 ± 0.363 0	0.137 0 ± 0.195 6	0.203 0 ± 0.280 7
平均 Mean	55.13	58.64	1.586 4 ± 0.480 7	1.359 5 ± 0.374 3	0.209 3 ± 0.198 1	0.312 8 ± 0.281 4
物种水平 Species level	92	97.87	1.978 7 ± 0.145 1	1.505 2 ± 0.336 0	0.301 2 ± 0.158 1	0.460 0 ± 0.199 2

1) NPL: 多态位点数 Numbers polymorphic loci; PPL: 多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci;  $N_a$ : 观察的等位基因数 Observed number of alleles;  $N_e$ : 有效等位基因数 Effective number of alleles;  $H_e$ : Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity;  $I$ : 香农指数 Shannon's information index.

## 2.4 遗传距离和聚类分析

为了进一步比较大花香水月季各居群间的遗传关系,本试验根据 Nei<sup>[11]</sup> 计算出不同居群间的遗传距离和遗传一致度(表 4)。居群间遗传一致度范围为 0.761 5 ~ 0.934 8, 遗传距离范围为 0.067 4 ~ 0.272 4。SHB 和 SL 居群之间一致度较高达到 0.934 8, 而 XS 和 MPS 居群之间的遗传一致度较低,为 0.761 5。

根据两两居群间的遗传距离进行聚类(图 2), 大致可分为 3 组: 来自云南昆明的 SHB、SL、FM 居群与来自云南蒙自的 LZC 居群一起聚为 1 组; 来自云南玉溪的 HT 和 MPS 聚成 1 组; 来自云南昆明的 TJX 和 XS 聚为 1 组。这说明云南省分布的 8 个大花香水月季居群并没有完全依据地理距离的远近而聚类, 遗传距离与地理位置无显著的相关性。

表 4 大花香水月季 8 个居群间 Nei's 遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 4 Nei's pairwise genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations of *R. odorata* var. *gigantea* Rehd. et Wils.

	SHB	TJX	XS	SL	FM	LZC	HT	MPS
SHB	—	0.881 5	0.848 2	0.934 8	0.927 5	0.879 7	0.883 8	0.870 9
TJX	0.126 2	—	0.919 3	0.893 1	0.847 1	0.861 2	0.840 6	0.791 9
XS	0.164 7	0.084 2	—	0.891 4	0.815 2	0.828 4	0.809 4	0.761 5
SL	0.067 4	0.113 1	0.115 0	—	0.919 4	0.872 5	0.885 2	0.851 5
FM	0.075 3	0.165 9	0.204 3	0.084 1	—	0.884 8	0.883 2	0.897 0
LZC	0.128 1	0.149 4	0.188 2	0.136 4	0.122 3	—	0.882 6	0.846 2
HT	0.123 5	0.173 7	0.211 5	0.122 0	0.124 2	0.124 9	—	0.906 0
MPS	0.138 2	0.233 3	0.272 4	0.160 8	0.108 7	0.167 0	0.098 7	—

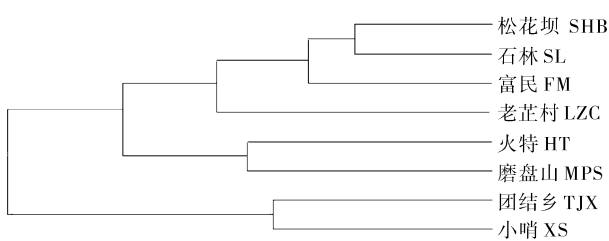


图 2 大花香水月季 Nei's 遗传距离的聚类图

Fig. 2 The dendrogram of 8 populations of *R. odorata* var. *gigantea* Rehd. et Wils. based on Nei's genetic distance

### 3 讨 论

#### 3.1 大花香水月季的遗传多样性

研究表明,作为珍稀的种质资源植物,大花香水月季自然居群维持着较高水平的遗传多样性。香农指数和 Nei's 指数既能反映条带的丰富程度,又能反映其均匀程度,丰富度与均匀度是衡量多样性的 2 个重要指标。Nei's 指数计算的各居群遗传多样性比香农指数计算的值偏低,但二者估计的各居群内平均遗传多样性的变化趋势一致。本研究的 8 个大花香水月季居群,其物种水平的 Nei's 基因多样性指数和香农信息指数分别为 0.301 2 和 0.460 0,高于广泛分布于云南地区的峨眉蔷薇(*Rosa omisnsis*)、绢毛蔷薇(*Rosa sericea*)<sup>[12]</sup>和云南金钱槭(*Dipteronia dyeriana*)<sup>[13]</sup>,低于分布范围广的金钱槭(*Dipteronia sinensis*)<sup>[11]</sup>和山荆子(*Malus baccata*)<sup>[14]</sup>。

本研究中的 8 个大花香水月季居群,不同地区的遗传多样性差异较大。其中滇中昆明地区的 SL 居群的多态位点百分率(74.47%)、Nei's 指数(0.261 2)、香农指数(0.391 5)均位列第一,说明该居群的遗传多样性最丰富。而滇中玉溪地区的 HT 居群和 MPS 居群的遗传多样性指数明显低于 8 个居群的平均值,表明这 2 个居群的遗传多样性相对

低于其他区域。这可能因为来自玉溪的大花香水月季居群是较近历史时期扩散分布而产生的。

#### 3.2 大花香水月季的遗传分化

植物居群间的遗传分化是长期进化的结果,包括分布范围的改变、生境的片断化和居群的隔离等,是基因突变、遗传漂变、交配系统、基因流以及自然选择等因素的综合反映<sup>[15]</sup>。大花香水月季居群在 SSR 分子水平上,其遗传分化系数为 0.305 1,高于 Hamrick 等<sup>[16]</sup>得出的木本植物的平均值,低于 Nybom<sup>[17]</sup>统计的自交植物平均值。该数据表明在物种水平上,大花香水月季居群内遗传变异(69.49%)大于居群间遗传变异(30.51%),居群内变异是其居群的主要变异来源,居群间也分布着较高的遗传多样性。这一结果同该居群的表型性状分析结果一致<sup>[7]</sup>。

基因流也是影响居群遗传分化的一个重要因素。居群遗传学理论认为,当每世代居群间迁移者多于或等于 1 时( $N_m \geq 1$ ),不管居群大小,只要基因流是多向性的,基因流就可以防止居群间由遗传漂变引起的遗传分化<sup>[18]</sup>。本研究计算得出大花香水月季的基因流为 1.139 1,表明遗传漂变不是其居群间遗传分化的主要影响因素。大花香水月季为异交昆虫授粉木本植物,这一生物学特性促进了其居群之间基因的频繁交流,从而有效地减小了居群间的遗传分化。

#### 参 考 文 献

[1] 张佐双,朱秀珍. 中国月季[M]. 北京:中国林业出版社,2006:32.  
 [2] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志:12 卷[M]. 北京:科学出版社,2006:571-600.  
 [3] 张靖国,胡红菊,徐育海,等. 部分湖北海棠种质的鉴定及亲缘关系分析[J]. 华中农业大学学报,2009,28(6):736-740.  
 [4] 邱显钦,张颖,李树发,等. 基于 SSR 分子标记分析云南月季种

- 质资源亲缘关系[J]. 西北植物学报, 2009, 29(9): 1764-1771.
- [5] 李冬波, 张端品, 林兴华. SSR 标记在疣粒野生稻和普通栽培稻中的多态性研究[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 1-4.
- [6] 胡磊, 高丽, 杨波. 利用磁珠富集法开发花榈木微卫星引物[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 629-633.
- [7] 邵珠华, 李名扬, 邱显钦, 等. 大花香水月季天然群体的表型多样性研究[J]. 江苏农业科学, 2010(2): 184-187.
- [8] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 10-23.
- [9] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990(12): 13-15.
- [10] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis[M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, 1997.
- [11] NEI M. Genetic distance between populations[J]. American Naturalist, 1972, 106: 283-292.
- [12] 周宁宁. 峨眉蔷薇和绢毛蔷薇的居群遗传多样性研究[D]. 昆明: 云南农业大学图书馆, 2010.
- [13] 李珊, 钱增强, 蔡宇良, 等. 金钱槭和云南金钱槭遗传多样性比较研究[J]. 植物生态学报, 2005, 29(5): 785-792.
- [14] 王雷宏, 郑玉红, 汤庚国. 8 个山荆子居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1337-1343.
- [15] SCHAAL B A, HAYWORTH D A, OLSEN K M, et al. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects[J]. Molecular Ecology, 1998, 7: 465-475.
- [16] HAMRICK J L, GODT M J M, SHERMAN-BROYLES S L. Factors influencing levels of genetic diversity of in woody plant species[J]. New Forests, 1992, 6: 95-124.
- [17] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant[J]. Mor Ecol, 2004, 13: 1143-1155.
- [18] WRIGHT S. The genetical structure of populations[J]. Annals of Genetics, 1951, 15: 323-354.

## SSR markers based genetic diversity of populations of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* in Yunnan Province

QIU Xian-qin<sup>1,2</sup> TANG Kai-xue<sup>1</sup> JIAN Hong-ying<sup>1</sup>

WANG Qi-gang<sup>1</sup> LI Shu-fa<sup>1</sup> SHAO Zhu-hua<sup>1</sup> ZHANG Hao<sup>1,2</sup>

1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences / Yunnan Flower Breeding Key Laboratory / Yunnan Flower Research and Development Center, Kunming 650205, China;

2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University / Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

**Abstract** The genetic diversity of eight natural populations of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* Rehd. et Wils. in Yunnan Province was analyzed with SSR markers. The result showed that 72 bands were amplified with twelve polymorphic primers. Polymorphic loci were 70 and percentage of polymorphism was 97.22%. At the level of species, the Nei's genetic diversity was 0.3012 and the Shannon information index was 0.4600, showing that the genetic diversity of the populations of *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* in Yunnan Province was abundant. It was 69.49% of genetic variation within populations, and 30.51% of genetic variation among populations. So the genetic variation within populations was the main reason of the genetic variation. The Nei's pairwise genetic identity and genetic distance were 0.7615-0.9348 and 0.0674-0.2724. The cluster analysis based on genetic distance showed that the genetic distance was not significantly related with the geographic location.

**Key words** *Rosa odorata* Sweet var. *gigantea* Rehd. et Wils.; genetic diversity; simple sequence repeat