

基于 SSR 标记构建宝巾花品种的分子指纹

孙利娜^{1,2},周 群³,黄妹平²,周长品¹,徐世松⁴,
杨舒婷²,杜 铃²,甘四明^{1,2*},唐 庆^{2*}

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 热带林业研究国家林业局重点实验室, 广东 广州 510520; 2. 广西壮族自治区林业科学研究院, 广西优良用材林资源培育重点实验室, 中南速生材繁育国家林业局重点实验室, 广西 南宁 530002; 3. 厦门市园林植物园, 福建 厦门 361003; 4. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:【目的】针对宝巾花(*Bougainvillea*)品种繁多、同物异名和同名异物多有发生的现象,利用可靠的分子标记技术进行品种的有效分类。【方法】基于 15 个简单重复序列(SSR)位点,利用荧光标记的引物对 131 个宝巾花品种进行 PCR 扩增,扩增产物经毛细管电泳检测,分析品种多样性和遗传距离,并构建品种聚类图和指纹图谱。【结果】15 个 SSR 位点共扩增出 85 个等位基因,平均每个位点的等位片段数 5.60 个,Shannon's 信息指数、观测杂合度和期望杂合度的变化范围分别为 0.38~1.53、0.11~0.94 和 0.16~0.73,平均值分别为 1.04、0.50 和 0.57,位点的多态性信息量介于 0.15~0.69 之间,平均 0.51。宝巾花品种的遗传距离为 0.00~0.65,平均 0.33;聚类分析表明,同一种的品种大多数聚在一类,但同一个种仍有品种未聚在一类或亚类,也有多个种的品种聚在一类;有多对品种存在同物异名或同名异物的现象;基于 11 个位点可有效鉴别 131 个品种,建立了各品种的分子指纹图谱。【结论】对同物异名或同名异物的品种,需要进一步确认品种中文名或拉丁名;基于 SSR 标记的宝巾花品种的指纹图谱为宝巾花品种登记、注册和知识产权保护提供了可靠技术,也为品种鉴定提供了有效手段。

关键词:宝巾花;品种分类;SSR 标记;指纹图谱;亲缘关系
中图分类号:S685.99;S722.3+9 文献标志码:A 开放科学(资源服务)标识码(OSID):
文章编号:1000-2006(2019)06-0060-07



Using the SSR fluorescent labling to establish SSR fingerprint for 131 cultivars in *Bougainvillea* (Nyctaginaceae)

SUN Lina^{1,2},ZHOU Qun³,HUANG Meiping²,ZHOU Changpin¹,XU Shisong⁴,
YANG Shuting²,DU Ling²,GAN Siming^{1,2*},TANG Qing^{2*}

(1. Key Laboratory of State Forestry Administration on Tropical Forestry Research, Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Superior Timber Trees Resource Cultivation & Key Laboratory of Central South Fast-growing Timber Cultivation of Forestry Ministry of China, Guangxi Forestry Research Institute, Nanning 530002, China; 3. Xiamen Botanical Garden, Xiamen 361003, China; 4. Tropical Crops Genetic Resources Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: 【Objective】 Find a reliable molecular marker to identify *Bougainvillea* cultivars that are difficult to distinguish, due to cultivar richness and cultivar homonymy and synonymy. 【Method】 A total of 15 simple sequence repeats (SSR) markers were used to amplify DNA samples from 131 *Bougainvillea* cultivars. SSR amplicons were detected by a capillary electrophoresis method. Cultivar polymorphism and genetic distance were calculated; they were used for clustering analysis and fingerprint construction of all the 131 cultivars. 【Result】 A total of 85 different alleles were collectively generated by the 15 SSR loci, averaging 5.60 alleles per locus. Shannon's information index, observed heterozygosity value, and expected heterozygosity value ranged from 0.38 to 1.53, 0.11 to 0.94 and 0.16 to 0.73, with an average of 1.04, 0.50 and 0.57 per locus, respectively. The polymorphism information content ranged from 0.15 to 0.69, with an

收稿日期:2018-12-26 修回日期:2019-06-24
基金项目:广西科技计划项目(桂科 AD17129021);“广西主要用材林资源高效培育与利用人才小高地”专项(桂财社函[2018]112 号)。
第一作者:孙利娜(sunlina8958170@126.com),工程师。* 通信作者:甘四明(Siming_Gan@126.com),研究员,ORCID(0000-0001-6677-9860),负责论文指导与修改;唐庆(335221247@qq.com),高级工程师,负责论文选题和实验设计指导,ORCID(0000-0003-2351-6889)。
引文格式:孙利娜,周群,黄妹平,等. 基于 SSR 标记构建宝巾花品种的分子指纹[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2019,43(6):60-66.

average of 0.51 per locus. The genetic distance between cultivars ranged from 0.00 to 0.65, with an average of 0.33. Clustering analysis showed that most of the cultivars within a species tended to fall in the same cluster, but some cultivars of the same, whereas certain cultivars from different species were grouped in the same cluster. Several pairs of cultivars were either homonyms or synonyms. Only 11 SSR loci were shown to be effective for identifying the 131 cultivars; thus, the molecular fingerprints of all these cultivars were constructed based on allelic combinations of the 11 markers. 【Conclusion】Further research should be conducted to verify either the Chinese or Latin names of some suspicious cultivars. SSR-based fingerprints of *Bougainvillea* cultivars constitute a reliable technique for cultivar identification, registration, and intellectual property protection as well as for cultivar clarification in production practices.

Keywords: *Bougainvillea*; cultivar classification; SSR; fingerprints; genetic relationship

紫茉莉科 (Nyctaginaceae) 叶子花属 (*Bougainvillea* Comm. ex Juss.) 植物统称宝巾花, 又称叶子花、九重葛、三角梅和勒杜鹃等, 全球共约 18 种 (<http://frps.eflora.cn/frps/Bougainvillea>), 另有变种、栽培种和杂交种 300 多个^[1-2]。宝巾花原产南美, 我国早在 19 世纪 80 年代就从欧洲引种到台湾, 此后华南各省广为栽培^[3]。常见观赏品种有‘青叶紫’(‘小叶浅紫’)(*B. glabra* ‘Elizabeth Angus’), ‘水红’(*B. glabra* ‘Rosa’), ‘大花深红’(*B. spectabilis* ‘Crimonlake’), ‘大花深紫’(*B. spectabilis* ‘Senjakala’), ‘印度画报’(*B. × buttiana* ‘Chitra’) 和‘金双色’(*B. peruviana* ‘Thimma’) 等 100 多个品种。宝巾花一般为二倍体, $2n = 48$ ^[4]。宝巾花因花粉管细小, 花粉和胚的活力低, 通过自然授粉和人工杂交获得新种质比较困难, 目前栽培的绝大部分品种由芽变或辐射诱变等方式获得^[5], 一些品种很难通过表型进行鉴定。并且, 国内宝巾花的命名存在同物异名和同名异物的现象, 给宝巾花品种的推广、保护和生产带来不利影响, 因此需要对宝巾花种质资源进行有效鉴定。

简单序列重复 (simple sequence repeats, SSR) 是指基因组上基序为 1~6 个碱基的重复序列, 具有数量丰富、共显性、多态性高和稳定性好等优点^[6-7]。SSR 可以通过多种技术进行检测, 其中基于荧光引物进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、再在测序仪上通过毛细管电泳进行 PCR 产物的自动检测技术具有高效、准确等优点^[8]。目前, 基于测序仪的 SSR 自动检测法已成功用于苹果 (*Malus* Mill.)^[9]、刺槐 (*Robinia pseud-acacia* L.)^[10]、桂花 (*Osmanthus fragrans*)^[11]、梨 (*Pyrus* spp)^[12] 和欧榛 (*Corylus avellana* L.)^[13] 等木本植物的品种指纹和鉴定研究。

已有一些研究者进行了宝巾花品种的鉴定, 如 Richa 等^[14] 利用随机扩增多态性 DNA 标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 对 21 个品种进行聚类分析, 李房英等^[15] 利用简单重复序列

间扩增 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 标记进行了 68 个品种的聚类分析; 孙利娜等^[16] 利用 SSR 标记研究了 18 个品种的遗传变异。但是, 已有研究中品种数量不是太多, 并且 ISSR 为显性标记, 需要对现有品种进行更完整的分子鉴定, 尤其是利用共显性的标记 (如 SSR, 本研究用的 SSR 标记是基于前期宝巾花转录组测序开发的多态性高、带型稳定的 15 个 SSR 位点)。因此, 本研究利用 SSR 标记构建了 131 个宝巾花品种的分子指纹, 旨在为宝巾花品种的分子鉴定和变异分析提供快速、可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料及其 DNA 提取和 SSR 标记实验

参试宝巾花品种 131 个 (表 1), 其中 18 个 (序号 1~18) 保存于广西壮族自治区林业科学研究院, 且已用于前期 SSR 标记的多样性检测^[12]、113 个 (序号 19~131) 保存于中国热带农业科学院热带作物品质资源研究所。从生长健壮、无病虫害的植株上采集幼嫩叶片, DNA 提取前贮存于 -80 ℃。

采用快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 提取幼嫩叶片的 DNA, DNA 浓度通过 1.2% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳与标准品对比测定。

选用之前开发自宝巾花转录组的 15 个 SSR 标记^[16], 前向引物用 Hex 或 Fam 荧光修饰 (Thermo Scientific, 上海)。PCR 反应体系 (10 μL) 见参考文献^[12]。PCR 扩增程序: 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s, 60 ~ 55 ℃ 每个循环降落 1 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 6 个循环; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 5 min。

取 1.0 μL 的 PCR 产物加入 9.34 μL 的 Hi-Di 甲酰胺和 0.16 μL 的内标, 在遗传分析仪 ABI 3730xl 上利用 GeneMapper 4.1 软件 (应用生物系统公司) 进行 SSR 等位片段的检测和标记分型。

表 1 参试的 131 个宝巾花品种

Table 1 The 131 *Bougainvillea* cultivars tested in this study

序号 No.	品种 cultivar	序号 No.	品种 cultivar	序号 No.	品种 cultivar
1	‘青叶紫’(‘小叶浅紫’)(<i>B. glabra</i> ‘Elizabeth Angus’)	45	‘斑叶小叶紫’(<i>B. × buttiana</i> ‘Sanderiana Variegata’)	89	‘粉蝶’(<i>B. sp.</i> ‘Feathery Fantasy Double Colour’)
2	‘粉粧’(<i>B. glabra</i> ‘Eva’)	46	‘宝花橙’(<i>B. × buttiana</i> ‘Louise Wathen’)	90	‘红蝶’(<i>B. sp.</i> ‘Ratana Pink’)
3	‘黄金叶’(<i>B. glabra</i> ‘Golden Lady’)	47	‘彩虹黄’(<i>B. × buttiana</i> ‘Yellow Wonder’)	91	‘红莲花’(<i>B. sp.</i> ‘Red Lotus’)
4	‘茄色’(<i>B. glabra</i> ‘Merial Fitzpartick’)	48	‘橙冰’(<i>B. × buttiana</i> ‘Louise Wathen Variegata’)	92	‘黄金大奖’(<i>B. sp.</i> ‘MonSam’)
5	‘塔紫’(<i>B. glabra</i> ‘Pink Pixie’)	49	‘红粉佳人’(<i>B. × buttiana</i> ‘Alick Lancaste’)	93	‘绿叶玉宝’(<i>B. sp.</i> ‘Ladybird’)
6	‘水红’(<i>B. glabra</i> ‘Rosa’)	50	‘加州黄金’(<i>B. × buttiana</i> ‘California Gold’)	94	‘蒙娜丽莎黄’(<i>B. sp.</i> ‘Mona Lisa Yellow’)
7	‘光叶斑叶紫花’(<i>B. glabra</i> ‘Variegata’)	51	‘金边叶重粉’(<i>B. × buttiana</i> ‘Los Banos Variegata’)	95	‘孟加拉红’(<i>B. sp.</i> ‘Royal Bengal Red’)
8	‘橙红’(<i>B. spectabilis</i> ‘Auratus’)	52	‘金发女郎’(<i>B. × buttiana</i> ‘Blondie’)	96	‘热带花’(<i>B. sp.</i> ‘Tropical Bouquet’)
9	‘胭脂红’(<i>B. spectabilis</i> ‘China Beauty’)	53	‘蓝月亮’(<i>B. × buttiana</i> ‘Blue Moon’)	97	‘塔黄’(<i>B. sp.</i> ‘Pixie Yellow’)
10	‘大花深红’(<i>B. spectabilis</i> ‘Crimonlake’)	54	‘绿叶橙’(<i>B. × buttiana</i> ‘Afterglow’)	98	‘蜥蜴橙’(<i>B. sp.</i> ‘Lguana Variegata’)
11	‘大花深紫’(<i>B. spectabilis</i> ‘Senjakala’)	55	‘绿叶柠檬黄’(<i>B. × buttiana</i> ‘Golden Glow’)	99	‘小粉雀’(<i>B. sp.</i> ‘Firecracker Purple’)
12	‘樱花’(<i>B. × spectoglabra</i> ‘Imperial Delight’)	56	‘水红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Miss Manila’)	100	‘小金雀’(<i>B. sp.</i> ‘Firecracker Yellow’)
13	‘金心’(<i>B. × spectoglabra</i> ‘Thimma’)	57	‘香港丽人’(<i>B. × buttiana</i> ‘Hong Kong Beauty’)	101	‘银边叶浅紫’(<i>B. sp.</i> ‘Pixie Orange’)
14	‘皱叶深红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Barbara Karst’)	58	‘小花大红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Mrs. Butt’)	102	‘暗斑叶加州黄金’(<i>B. sp.</i>)
15	‘暗斑叶橙红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Lateritia’)	59	‘猩红皇后’(<i>B. × buttiana</i> ‘San Diego Red’)	103	‘冰斑美人’(<i>B. sp.</i>)
16	‘柠檬黄’(<i>B. × buttiana</i> ‘Mrs McLean’)	60	‘怡锦’(<i>B. × buttiana</i> ‘Cherry Blossom’)	104	‘波依斯玫瑰’(<i>B. sp.</i>)
17	‘重瓣大红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Pretoria’)	61	‘印度画报’(<i>B. × buttiana</i> ‘Chitra’)	105	‘大蜜叶精灵’(<i>B. sp.</i>)
18	‘斑叶塔紫’(<i>B. × buttiana</i> ‘Temple Fire’)	62	‘重斑粉’(<i>B. × buttiana</i> ‘Los Banos Beauty’)	106	‘红宝石’(<i>B. sp.</i>)
19	‘福摩斯’(<i>B. glabra</i> ‘Formosa’)	63	‘重瓣橙’(<i>B. × buttiana</i> ‘Roseville’s Delight’)	107	‘红粉夫人’(<i>B. sp.</i>)
20	‘安格斯’(<i>B. glabra</i> ‘Elizabeth Angus’)	64	‘重瓣红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Mahara’)	108	‘红九月’(<i>B. sp.</i>)
21	‘暗斑叶白’(<i>B. glabra</i> ‘Bambino Beesnees’)	65	‘重瓣黄’(<i>B. × buttiana</i> ‘Aussie Gold’)	109	‘红叶大红’(<i>B. sp.</i>)
22	‘白雪公主’(<i>B. glabra</i> ‘Alba’)	66	‘重瓣枣红’(<i>B. × buttiana</i>)	110	‘金边小叶紫’(<i>B. sp.</i>)
23	‘斑叶怡锦’(<i>B. glabra</i> ‘Mrs. Eusenia Raja Singhe’)	67	‘重瓣白’(<i>B. × buttiana</i>)	111	‘金龟紫’(<i>B. sp.</i>)
24	‘光叶紫’(<i>B. glabra</i> ‘Sanderiana’)	68	‘帕塔’(<i>B. peruviana</i> ‘Partha’)	112	‘金叶浅粉’(<i>B. sp.</i>)
25	‘金边安格斯’(<i>B. glabra</i> ‘Elizabeth Angus Variegata’)	69	‘斑叶印度橙粉’(<i>B. peruviana</i> ‘Partha Variegata’)	113	‘拉非泰’(<i>B. sp.</i>)
26	‘金边叶浅紫’(<i>B. glabra</i> ‘Mrs. Eva Variegata Mauve II’)	70	‘红心樱花’(<i>B. peruviana</i> ‘Makris’)	114	‘绿叶浅黄’(<i>B. sp.</i>)
27	‘金叶白’(<i>B. glabra</i> ‘JinYu’)	71	‘金双色’(<i>B. peruviana</i> ‘Thimma’)	115	‘浅色樱花’(<i>B. sp.</i>)
28	‘哭泣的美人’(<i>B. glabra</i> ‘Variegata’)	72	‘口红’(<i>B. peruviana</i> ‘Begum Sikander’)	116	‘仁斑叶紫’(<i>B. sp.</i>)
29	‘柳叶白’(<i>B. glabra</i> ‘Shweta’)	73	‘绿叶官粉’(<i>B. peruviana</i> ‘Mrs. H. C. Buck’)	117	‘洒金叶橙’(<i>B. sp.</i>)
30	‘绿叶浅紫’(<i>B. glabra</i> ‘Mrs. Eva’)	74	‘蒙娜丽莎’(<i>B. peruviana</i> ‘Mona Lisa’)	118	‘沙瓣叶艳红’(<i>B. sp.</i>)
31	‘塔红’(<i>B. glabra</i> ‘Pink Pixie’)	75	‘洋红公主’(<i>B. peruviana</i> ‘Mrs. H. C. Buck’)	119	‘沙瓣叶紫’(<i>B. sp.</i>)
32	‘小叶紫’(<i>B. glabra</i> ‘Royal Purple’)	76	‘印度橙粉’(<i>B. peruviana</i> ‘Partha’)	120	‘莎莎’(<i>B. sp.</i>)
33	‘新加坡白’(<i>B. glabra</i> ‘Singapore White’)	77	‘樱花’(<i>B. peruviana</i> ‘Imperial Delight’)	121	‘索菲亚’(<i>B. sp.</i>)
34	‘新加坡粉’(<i>B. glabra</i> ‘Singapore Beauty’)	78	‘火焰’(<i>B. spectabilis</i> ‘Flame’)	122	‘顽皮’(<i>B. sp.</i>)
35	‘雪紫’(<i>B. glabra</i> ‘Snow Purple’)	79	‘毛叶’(<i>B. spectabilis</i> ‘Splendens’)	123	‘小花粉紫’(绿叶)(<i>B. sp.</i>)
36	‘牙买加白’(<i>B. glabra</i> ‘Jamaica White’)	80	‘玫红’(<i>B. spectabilis</i> ‘B. J. F. Bailey’)	124	‘小叶小红粉’(<i>B. sp.</i>)
37	‘胭脂红’(<i>B. glabra</i> ‘Zinia Barat’)	81	‘热火桑巴’(<i>B. spectabilis</i> ‘Flame’)	125	‘异叶红’(<i>B. sp.</i>)
38	‘银边叶白’(<i>B. glabra</i> ‘Mrs. Eva Variegata White’)	82	‘小红雀’(<i>B. spectabilis</i> ‘Tomato Red’)	126	‘银河’(<i>B. sp.</i>)
39	‘银河’(<i>B. glabra</i> ‘Galaxy’)	83	‘婴儿玫瑰’(<i>B. spectabilis</i> ‘Baby Rose’)	127	‘银沙丽人’(<i>B. sp.</i>)
40	‘紫蝶’(<i>B. glabra</i> ‘Mrs. Eva Purple Ratana’)	84	‘砖红’(<i>B. spectabilis</i> ‘Lateritia’)	128	‘杂斑叶大红’(<i>B. sp.</i>)
41	‘紫丁香美女’(<i>B. glabra</i> ‘Lilac Beauty’)	85	‘暗斑叶樱花’(<i>B. sp.</i> ‘Blushing Beauty’)	129	‘杂斑叶水红’(<i>B. sp.</i>)
42	‘暗斑叶橙’(<i>B. × buttiana</i> ‘Jinda Orange’)	86	‘斑叶塔橙’(<i>B. sp.</i> ‘Pixie Orange Variegata’)	130	‘紫叶布丁’(<i>B. sp.</i>)
43	‘暗斑叶红’(<i>B. × buttiana</i> ‘Juanita Hatten’)	87	‘橙灯笼’(<i>B. sp.</i> ‘Chinese Lantern’)	131	‘总统紫’(<i>B. sp.</i>)
44	‘巴特夫人’(<i>B. × buttiana</i> ‘Mrs. Butt’)	88	‘橙蝶’(<i>B. sp.</i> ‘Ratana Orange’)		

注:序号 1—18 的品种保存于广西壮族自治区林业科学研究院^[16],序号 19—131 的品种保存于中国热带农业科学院热带作物品质资源研究所。*B. glabra*. 光叶宝巾花;*B. × buttiana*. 巴特宝巾花;*B. peruviana*. 秘鲁宝巾花;*B. spectabilis*. 毛叶宝巾花;*B. × spectoglabra*. 光叶×毛叶杂交宝巾花。No. 1–18 and No. 19–131 cultivars were conserved in Guangxi Forestry Research Institute (Nanning, China)^[16] and Tropical Crops Genetic Resources Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (Danzhou, China), respectively.

1.2 数据分析

对于 15 个 SSR 位点,利用软件 PowerMarker 3.25^[17]计算多态性信息量 (polymorphism information content, PIC),利用 GenAlEx 6.5.1^[18]计算等位片段数 (number of alleles, N_a)、有效等位片段数 (number of effective alleles, N_e)、香农信息指数 (Shannon's information index, I)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 和品种间遗传距离 (genetic distance, GD, 公式中用 D_{GD} 表示)。基于 D_{GD} 矩阵,利用软件 NTSYSpc 2.1^[19]采用非加权分组算术平均 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 法进行品种的聚类。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点的多态性

使用 15 个开发自转录组的 SSR 位点对 131 个宝巾花品种扩增共获得等位片段数 85 个 (表 2), 单个引物的等位片段数为 3 (位点 BOUeSSR04 和 BOUeSSR16) ~ 9 (位点 BOUeSSR02), 平均 5.60。有效等位片段数介于 1.19 (BOUeSSR13) ~ 3.63 (BOUeSSR04) 之间, 平均为 2.52。Shannon's 信息指数为 0.38~1.53, 最高的为位点 BOUeSSR04, 最低的为 BOUeSSR13; H_o 范围为 0.11~0.94, 平均为

表 2 15 个 SSR 位点基于 131 个品种的多态性参数
Table 2 Polymorphic parameters of the 15 SSR loci based on the 131 Bougainvillea cultivars

EST-SSR 引物 EST-SSR primer	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC
BOUeSSR01	8.00	3.36	1.42	0.91	0.70	0.65
BOUeSSR02	3.00	1.98	0.76	0.15	0.49	0.39
BOUeSSR03	5.00	2.37	1.01	0.37	0.58	0.49
BOUeSSR04	9.00	3.63	1.53	0.49	0.73	0.69
BOUeSSR05	7.00	3.34	1.39	0.44	0.70	0.66
BOUeSSR06	6.00	2.50	1.07	0.84	0.60	0.53
BOUeSSR08	4.00	3.08	1.16	0.94	0.68	0.61
BOUeSSR09	4.00	2.33	0.96	0.78	0.57	0.48
BOUeSSR10	4.00	1.83	0.78	0.16	0.45	0.39
BOUeSSR11	7.00	2.28	1.12	0.58	0.56	0.51
BOUeSSR12	4.00	1.90	0.70	0.14	0.47	0.37
BOUeSSR13	5.00	1.19	0.38	0.11	0.16	0.15
BOUeSSR14	4.00	2.91	1.10	0.84	0.66	0.58
BOUeSSR15	6.00	2.59	1.15	0.60	0.61	0.56
BOUeSSR16	9.00	2.58	1.15	0.20	0.61	0.54
均值 mean	5.60	2.52	1.04	0.50	0.57	0.51

0.50, 最高的为 BOUeSSR08, 最低的为 BOUeSSR13; H_e 范围为 0.16~0.73, 平均为 0.57, 最高的为 BOUeSSR04, 最低的为 BOUeSSR13; PIC 平均为 0.51, 最高的是 BOUeSSR04, 最低的是 BOUeSSR13, 有 8 个位点 (BOUeSSR01、BOUeSSR04、BOUeSSR05、BOUeSSR06、BOUeSSR08、BOUeSSR11、BOUeSSR15 和 BOUeSSR16) 为高度多态位点 (PIC 值>0.50)。

2.2 基于毛细管电泳的宝巾花品种聚类分析

基于 15 个 SSR 位点计算的宝巾花 131 个品种间 GD 范围为 0.00~0.60, 平均为 0.33。利用 UPGMA 法对 131 个宝巾花品种进行聚类分析, 建立聚类分析树状图 (图 1), 从聚类图可以看出, 在遗传距离 0.42 处, 131 个品种分为五大类群, 即类群 1、类群 2、类群 3、类群 4 和类群 5。

类群 1 包含两个品种 (19 号和 4 号), 均为光叶宝巾花品种 (*B. glabra* Choisy)。类群 2 包含 4 个品种 (11 号、7 号、9 号和 2 号), 均为光叶宝巾花品种。类群 3 包含 4 个品种, 其中 2 个光叶宝巾花品种 (25 号和 20 号)、1 个毛叶宝巾花品种 (*B. spectabilis*) (79 号) 和 1 个拉丁名不详的品种 (131 号)。

类群 4 包含 5 个种的 45 个品种, 其中有 11 个巴特宝巾花 (*B. × buttiana* Holttum & Bonpiand)、3 个毛叶宝巾花 (*B. spectabilis* Wild.)、3 个光叶宝巾花、2 个光叶×毛叶杂交种 (*B. × spectoglabra*)、7 个秘鲁宝巾花 (*B. peruviana* Humboldt & Bonpiand)、19 个拉丁名不详的品种。在遗传距离 0.30 处, 类群 4 可再分为 4 个亚群。亚群 4-I 包含 1 个巴特宝巾花品种 (18 号) 和 1 个光叶宝巾花品种 (5 号)。亚群 4-II 包含 1 个光叶宝巾花 (31 号) 和 7 个拉丁名不详的品种 (99 号、97 号、119 号、31 号、118 号、116 号、86 号和 105 号)。亚群 4-III 包含 3 个巴特宝巾花品种 (15 号、14 号和 16 号)、1 个光叶宝巾花品种 (6 号)、2 个光叶×毛叶杂交种 (13 号和 12 号) 和 1 个拉丁名不详的品种 (85 号)。在遗传距离 0.20 处, 亚群 4-IV 又可分为 4-IV A、4-IV B 和 4-IV C 3 个小类, 其中 4-IV A 小类包括 1 个巴特宝巾花品种 (53 号)、5 个秘鲁宝巾花品种 (71 号、72 号、70 号、74 号和 75 号)、2 个拉丁名不详的品种 (94 号和 122 号); 4-IV B 小类包括 5 个巴特宝巾花品种 (57 号、55 号、43 号、48 号和 42 号)、1 个毛叶宝巾花品种 (78 号)、8 个拉丁名不详的品种 (93 号、121 号、114 号、90 号、89 号、88 号、91 号和 108 号); 4-IV C 小类包括 1 个巴特宝巾花品种 (56

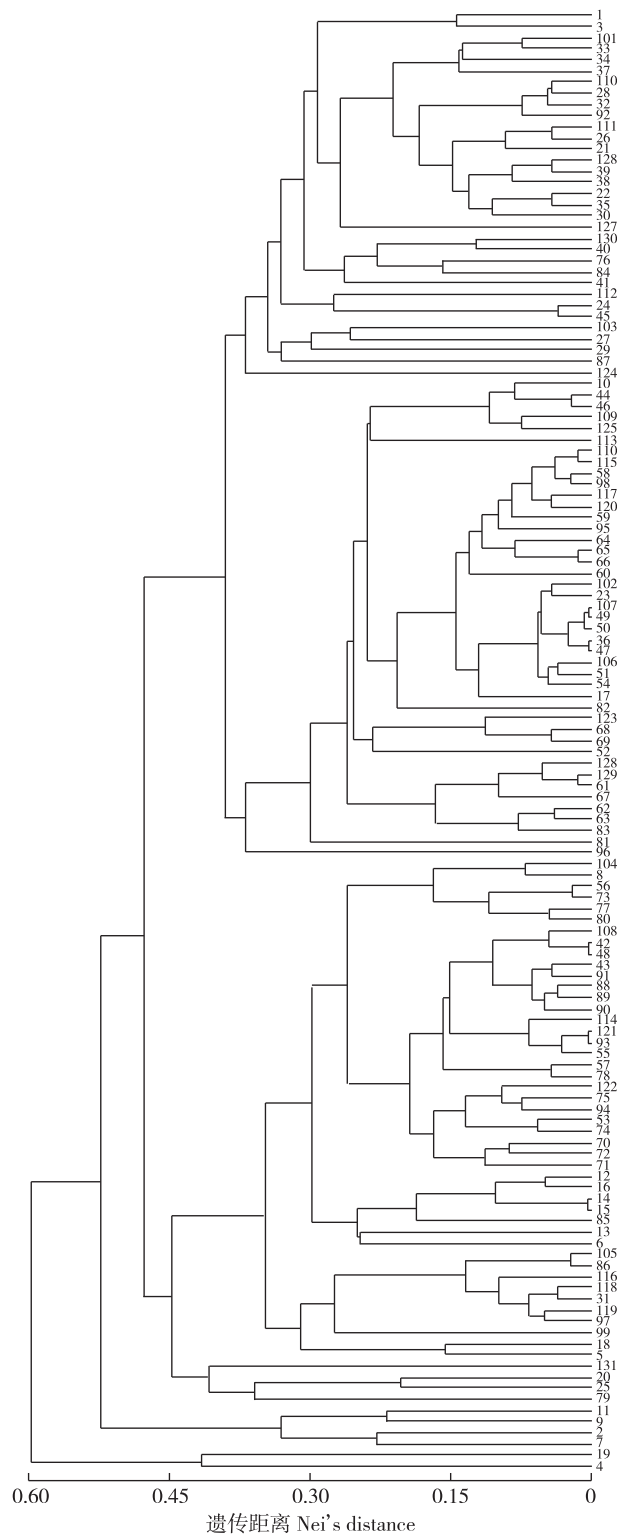


图1 131个宝巾花品种的聚类分析

Fig.1 The dendrogram of 131 *Bougainvillea* cultivars

号)、2个毛叶宝巾花品种(80号和8号)、2个秘鲁宝巾花品种(77号和73号)、1个拉丁名不详的品种(104号)。

类群5包含4个种的76个品种,其中21个光叶宝巾花品种、21个巴特宝巾花品种、5个毛叶宝

巾花品种、3个秘鲁宝巾花品种、25个拉丁名不详的品种。在遗传距离0.39处,类群5可再分为亚群5-I、亚群5-II、亚群5-III和亚群5-IV。亚群5-I只包含1个拉丁名不详的品种(96号)。在遗传距离0.26处,亚群5-II又可分为5-II A、5-II B、5-II C、5-II D和5-II E 5个小类,其中5-II A小类只包含1个拉丁名不详的品种(96号);5-II B小类包含4个巴特宝巾花品种(63号、62号、67号和61号)、1个毛叶宝巾花品种(83号)、2个拉丁名不详的品种(129号和128号);5-II C小类包括1个巴特宝巾花品种(52号)、2个秘鲁宝巾花品种(69号和68号)、1个拉丁名不详的品种(123号);5-II D小类包含2个光叶宝巾花品种(36号和23号)、1个毛叶宝巾花品种(82号)、12个巴特宝巾花品种(17号、54号、51号、47号、50号、49号、60号、66号、65号、64号、59号和58号)、9个拉丁名不详的品种(106号、107号、102号、95号、120号、117号、98号、115号和100号);5-II E小类包括1个毛叶宝巾花品种(10号)、2个巴特宝巾花品种(46号和44号)、3个拉丁名不详的品种(113号、125号和109号)。亚群5-III只包含1个拉丁名不详的品种(124号)。在遗传距离0.33处,亚群5-IV又可分为5-IVA、5-IVB、5-IVC、5-IVD和5-IVE 5个小类,其中5-IVA小类只包含1个拉丁名不详的品种(87号);5-IVB小类包含2个光叶宝巾花品种(29号和27号)、1个拉丁名不详的品种(103号);5-IVC小类包含1个光叶宝巾花品种(24号)、1个巴特宝巾花品种(45号)、1个拉丁名不详的品种(112号);5-IVD小类包含2个光叶宝巾花品种(41号和40号)、1个毛叶宝巾花品种(84号)、1个秘鲁宝巾花品种(76号)、1个拉丁名不详的品种(130号);5-IVE小类包括14个光叶宝巾花品种(30号、35号、22号、38号、39号、21号、26号、32号、28号、37号、34号、33号、31号和1号)、6个拉丁名不详的品种(127号、126号、111号、92号、110号和101号)。

根据聚类图可以看出,131个品种间的亲缘关系较近,说明它们的遗传背景较为简单,但是基于15个SSR位点,131个品种均被分开聚类,说明品种之间存在一定的遗传差异。

2.3 宝巾花品种指纹图谱构建

基于15个SSR位点对113个宝巾花品种的扩增结果,可将所有品种完全区分开,但至少需要11个位点才可有效鉴别131个品种,即SSR位点BOUeSSR01、BOUeSSR03、BOUeSSR04、BOUeSSR05、

BOUeSSR06、BOUeSSR08、BOUeSSR09、BOUeSSR10、BOUeSSR11、BOUeSSR15 和 BOUeSSR16。基于 11 个 SSR 位点的各品种分子指纹见该文 OSID 二维码。

3 讨 论

基于荧光标记的毛细管电泳技术可有效检测 SSR 分子变异,可有效检测相差 1 bp 的片段变异^[20-21],该方法具有检测结果稳定、高效、准确等优点,可有效用于宝巾花种质资源的检测与分析。目前,还未曾利用毛细管电泳对宝巾花属植物进行 SSR 检测及群体多样性和品种指纹分析,笔者基于前期开发的宝巾花 SSR 引物对此进行了探索研究。基于 15 个 SSR 位点对 131 个宝巾花品种的扩增共获得 85 个等位片段,不同引物扩增的等位片段数从 3 到 9 不等,Shannon's 信息指数均值 1.04,平均观测杂合度 0.50,平均期望杂合度为 0.57,评价多态性信息量为 0.51,表明 SSR 检测的有效性较高。参试的 131 个宝巾花品种均可有效鉴定(完全鉴别出 131 个品种至少需要 11 个位点),表明 SSR 对品种鉴定的可靠性较高。

宝巾花品种间的遗传距离在 0.00~0.60 之间,多数品种之间的遗传距离较低,表明供试宝巾花品种间遗传变异水平相对较低,这与 Richa 等^[14]、李房英等^[15]、孙利娜等^[16]的研究结果相似。宝巾花遗传多样性不高的原因可能是长期的无性繁殖和人工选育减少了品种之间的种质资源交流,基因分化逐渐减少,育种材料的遗传基础日益狭窄。

聚类分析中每个种的大部分品种聚在一类,如巴特宝巾花 31 个品种中 20 个(64.5%)聚在类群 5,光叶宝巾花 30 个品种中 19 个(63.3%)聚在亚群 5-Ⅱ,秘鲁宝巾花 10 个品种中 7 个(70.0%)聚在类群 4。但是,同一种仍有品种未聚在一类,如光叶宝巾花品种 19 号和 4 号在类群 1,而 11 号、7 号、9 号和 2 号在类群 2,且与其主要聚类的亚群 5-Ⅳ明显分开。此外,也有多个种的品种聚在一类,如类群 4 包括了所有的种和杂种。与李房英等^[15]基于 ISSR 的 68 个品种的聚类结果比较,品种名相同的 16 个品种的聚类关系很相似,如同属小类 5-Ⅳ的品种 32 号、34 号、37 号和 29 号聚在小类 5-Ⅱ B(李房英等的品种编号依次为 19、23、36、8 和 29,聚为 A 类),14 号、55 号、12 号、6 号、5 号、13 号和 18 号聚在类群 4(李房英等品种编号 28、68、56、66、45、34 和 46,聚为 B 类)。但是,基于分子标记

的聚类结果与传统品种分类关系并不严格对应,表明传统的表型分类与分子检测的结果仍然存在一定的差别。

拉丁名不详的 47 个品种分别聚在类群 4 和类群 5,从所处类群较难推测其所属物种,但考虑到最先聚类的品种亲缘关系最近应属同一物种(如 1 号与 3 号、22 号与 35 号最先聚类,都是光叶宝巾花),则可从最先聚类的已知品种推测未知品种所属的种,如 111 号与 26 号最先聚类,26 号为光叶宝巾花,推测 111 号也为光叶宝巾花。

宝巾花品种繁多,基于 SSR 标记可有效检测同名异物或同物异名的品种。比如 1 号(青叶紫)和 20 号(安格斯)、44 号(巴特夫人)和 58 号(小花大红)、68 号(帕塔)和 76 号(印度橙粉)、7 号(光叶斑叶紫花)和 28 号(哭泣的美人)品种中文名不同,但拉丁名(英文品种名)相同。聚类分析将每对品种截然分开,因此应是不同品种,拉丁名有待进一步确认;12 号和 77 号中文品种名都是樱花,但拉丁名不同,且聚在类群 4 的不同亚群(12 号聚在亚群 4-Ⅲ,77 号聚在亚群 4-Ⅳ),因此应是同名的不同品种,中文品种名需要进一步确认。

131 个宝巾花品种可用 11 个 SSR 位点进行有效的鉴别,并建立了基于各位点等位片段组合的品种分子指纹。品种分子指纹可以作为品种身份证^[22],是品种注册、保护和鉴定的重要依据。笔者首次基于 SSR 标记构建了我国宝巾花品种的指纹图谱,为宝巾花品种登记、注册和知识产权保护提供了可靠技术。此外,宝巾花品种的同名异物和同物异名现象给生产和科研来诸多不便,品种分子指纹也为品种鉴定提供了有效手段。

参考文献(reference):

[1] 周群. 三角梅的品种分类[M]. 北京: 金盾出版社, 2009.
ZHOU Q. *Bougainvillea* cultivation and appreciation [M]. Beijing: Golden Shield Press, 2009.

[2] 周群. 中国叶子花属植物种质资源及其繁殖技术研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 321-324.
ZHOU Q. Research on germplasm resource and propagational technique of *Bougainvillea* L. in China [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(12): 321-324.

[3] 周群, 黄克福, 丁印龙, 等. 中国引栽三角梅属观赏品种的调查与分类鉴定[J]. 江西农业学报, 2011, 23(5): 53-56. DOI:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2011.05.017.
ZHOU Q, HUANG K F, DING Y L, et al. Investigation and taxonomic identification on introduced ornamental varieties in *Bougainvillea* in China [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(5): 53-56.

[4] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱(第三册): 中国园林花卉植物染色体图谱[M]. 北

- 京: 科学出版社, 2003.
- CHEN R Y, SONG W Q, LI X L, et al. Chromosome atlas of major economic plants genome in China, III [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [5] 孙利娜, 王华新, 龚建英, 等. 宝巾花辐射诱变效应研究初报[J]. 北方园艺, 2013(19): 91-93.
- SUN L N, WANG H X, GONG J Y, et al. Preliminary study on the mutagenic effects of radiation on *Bougainvillea glabra* [J]. Northern Horticulture, 2013(19): 91-93.
- [6] JARNE P, LAGODA P J L. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1996, 11(10): 424-429. DOI: 10.1016/0169-5347(96)10049-5.
- [7] KALIA R K, RAI M K, KALIA S, et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. Euphytica, 2011, 177(3): 309-334. DOI: 10.1007/s10681-010-0286-9.
- [8] 程本义, 夏俊辉, 龚俊义, 等. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 672-676. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7216.2011.06.016.
- CHENG B Y, XIA J H, GONG J Y, et al. Application of capillary electrophoresis detection with fluorescent SSR markers in rice DNA fingerprint identification [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2011, 25(6): 672-676.
- [9] 高源, 刘凤之, 王昆, 等. 基于 TP-M13-SSR 指纹图谱的中国原产苹果属植物分子身份证的建立[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1290-1297. DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.2015.06.022.
- GAO Y, LIU F Z, WANG K, et al. Establishment of molecular identity card for *Malus* Mill. originated from China based on the fingerprints of TP-M13-SSR [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(6): 1290-1297.
- [10] 毛秀红, 郑勇奇, 孙百友, 等. 基于 SSR 的刺槐无性系遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 林业科学, 2017, 53(10): 80-89. DOI: 10.11707/j.1001-7488.20171009.
- MAO X H, ZHENG Y Q, SUN B Y, et al. Genetic diversity and fingerprints of *Robinia pseudoacacia* clones based on SSR markers [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(10): 80-89.
- [11] 段一凡, 王贤荣, 梁丽丽, 等. 桂花品种 SSR 荧光指纹图谱的构建[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(S1): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.2014.S1.001.
- DUAN Y F, WANG X R, LIANG L L, et al. Fingerprinting and identification of *Osmanthus fragrans* cultivars using fluorescence-labeled SSR markers [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2014, 38(S1): 1-6.
- [12] 王龙, 薛华柏, 杨健, 等. 80 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2016, 33(增刊): 43-51. DOI: 10.13925/j.cnki.gsx.2016.S.05.
- WANG L, XUE H B, YANG J, et al. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 80 pear cultivars [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(supplement): 43-51.
- [13] 王童欣, DAVID E A, 罗灿, 等. 基于 SSR 分子标记技术的欧榛品种遗传多样性分析[J]. 2018, 16(19): 6415-6420. DOI: 10.13271/j.mph.016.006415.
- WANG T X, DAVID E A, LUO C, et al. Genetic diversity analysis of *Corylus avellana* L. cultivars based on SSR molecular marker technology [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(19): 6415-6420.
- [14] RICHA S, SUDHIR S, ARVIND S, et al. RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars [J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2009(9): 154-163. DOI: 10.12702/1984-7033.v09n02a08.
- [15] 李房英, 黄彦晶, 吴少华. 三角梅种质资源的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1692-1696. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2011.09.022.
- LI F Y, HUANG Y J, WU S H. ISSR analysis of germplasm resources of *Bougainvillea spectabilis* Willd [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(9): 1692-1696.
- [16] 孙利娜, 林茂, 陈升侃, 等. 宝巾花基于转录组测序的 SSR 标记的开发和应用[J/OL]. 分子植物育种, 1-16[2019-11-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s;20191011.1624.006.html>.
- SUN L N, LIN M, CHEN S K, et al. Development and application of SSR markers derived from RNAseq data in *Bougainvillea* (Nyctaginaceae) [J]. Molecular Plant Breeding, 1-16[2019-11-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s;20191011.1624.006.html>.
- [17] LIU K, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti282.
- [18] PEAKALL R, SMOUSE P. GenAEx 6: genetic analysis in excel: population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- [19] ROHLF F J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 [EB/OL]. [2017-01-12]. <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>.
- [20] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149. DOI: 10.3321/j.issn:0496-3490.2005.02.002.
- HAO C Y, WANG L F, JIA J Z, et al. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 144-149.
- [21] 李莉, 杨剑波, MACKILL D J, 等. 水稻 SSR 不同检测和分析方法的比较研究[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(3): 185-188. DOI: 10.16819/j.1001-7216.2000.03.015.
- LI L, YANG J B, MACKILL D J, et al. Comparison of different detection methods for rice SSR analysis [J]. China J Rice Sci, 2000, 14(3): 185-188.
- [22] 刘新龙, 马丽, 陈学宽, 等. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建[J]. 作物学报, 2010, 36(2): 202-210. DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00202.
- LIU X L, MA L, CHEN X K, et al. Establishment of DNA fingerprint ID in sugarcane cultivars in Yunnan, China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(2): 202-210.

(责任编辑 刘昌来)