

香榧遗传多样性的ISSR分析¹

戴正, 陈力耕

浙江大学农业与生物技术学院, 杭州(310029)

摘要: 利用 ISSR-PCR 方法对香榧本地 9 个实生品种和 8 个无性系进行了遗传多样性的分析, 从 50 条 ISSR 引物中选出 12 个引物, 共扩增出 104 个 DNA 片断, 其中 88 个片断呈现多态性, 占总扩增的 84.6%。依据扩增结果进行遗传距离分析, 利用 UPGMA 构建了分子树状图。聚类结果把供试的香榧 9 个实生品种和 8 个无性系分为两大类, 并对栽培品种细榧的起源关系和无性系品种内的遗传分化进行了探讨。

关键词: 香榧, ISSR, 遗传多样性

香榧 (*Torreya grandis* Fort.) 属裸子植物红豆杉科 (Taxaceae) 榧属 (*Torreya*) 植物, 系第三纪孑遗植物。原产我国亚热带湿润气候的山区, 主要分布在长江流域以南的浙江、江苏、安徽、江西、福建、湖北、湖南、四川、贵州、云南等省。目前大部分地区仍为野生或半野生状态, 是我国珍贵稀有的干果果树, 具有食用、药用、材用、绿化等多种用途, 适用于南方山区发展的经济林果。浙江省是我国香榧栽培面积最大, 产量最高的省份, 主产于诸暨、嵊州、绍兴、东阳交界的会稽山脉。在香榧 1300 多年的栽培历史中, 由于多采用实生繁殖, 因此, 变异类型丰富, 遗传多样性明显。

自 20 世纪 90 年代以后, 由于 DNA 分子标记技术的出现为在 DNA 分子水平上研究果树资源的遗传多样性、品种鉴定、系统发育、起源、演化与分类提供了强有力的工具^[1-2]。ISSR (inter-simple sequence repeats) 分子标记, 是由 Zietkiewicz 等^[6]1994 年提出的一种新的分子标记技术, 该技术检测的是两个 SSR 之间的一段 DNA 序列上的多态性, 它是利用真核生物基因组中广泛存在的 SSR 序列, 设计出各种能与 SSR 序列结合的 PCR 引物, 对两个相距较近、方向相反的 SSR 序列之间的 DNA 区段进行扩增。ISSR 技术与 RFLP 和 RAPD 相比, 具有较高的多态性, 它克服了 RFLP 与 AFLP 操作复杂、成本高, RAPD 技术稳定性差、重复性低、容易产生假阳性以及 SSR 技术难于获得引物等缺点, 具有实验操作简单、快捷、灵敏度高、可靠性与稳定性好、重复性高等优点, 近年来, ISSR 分析技术在品种鉴定、遗传多样性研究、指纹图谱的构建等方面得到广泛的应用。本研究利用 ISSR 分子标记技术对浙江本地香榧的 9 个实生品种和一个栽培品种的 8 个无性系进行了遗传多样性的研究, 旨在为科学准确地地区分品种、品系、类型, 揭示其起源、演化关系, 筛选出优良种质提供可靠的分子水平的依据。

1. 材料和方法

1.1 植物材料

本实验所取香榧材料为当年生幼叶, 均采自浙江省诸暨市赵家镇钟家岭。供试品种如下:

¹本课题得到教育部博士点基金项目 (20030335118) 的资助。

表1 供试的材料及其主要形态特征
Table 1 Plant materials used for ISSR analysis in this study and their morphological characters

品种 Species	样品编号 (Specimen No.)	采集地点 (Locality)	种子形状 shape of seeds
大圆榧	1	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	圆形
小圆榧	2	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	圆形
米榧	3	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
茄榧	4	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
獠牙榧	5	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
芝麻榧	6	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
旋纹榧	7	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
落霜榧	8	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	圆形
细榧 (优1)	9	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (优2)	10	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (优3)	11	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (优4)	12	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (优5)	13	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (优6)	14	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (芽变)	15	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
细榧 (介龙)	16	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形
象牙榧	17	浙江省诸暨市赵家镇钟家岭	长形

1.2 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法提取香榧的总 DNA，用 1.0% 的琼脂糖电泳检测，DNA 的浓度和纯度通过分光光度计测定。

1.3 ISSR 反应的条件和程序

ISSR-PCR 扩增反应是在 eppendorf PCR 仪上进行，反应条件经过优化确定为：25 μ L 的 PCR 反应液中含：模板约 60ng，1U Taq 酶，1.5mmol/L MgCl₂，4 种 dNTP 各 0.25mmol/L，0.3 μ mol/L 引物。PCR 扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min，然后进行 45 个循环：94 $^{\circ}$ C 变性 30s，50—55 $^{\circ}$ C 复性 45s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30s，循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖上电泳，EPSON 紫外自动成像仪照相。

表2 ISSR 引物序列和特异性条带数目
Table 2 List of 12 ISSR primers and polymorphic bands obtained in the study

引物编号及序列 Sequence of primer	统计条带数 Number of bands scored	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性条带比率 PPB
UBC808 (AG) ₈ C	6	6	100
UBC812 (GA) ₈ A	5	3	60
UBC 813 (CT) ₈ T	15	13	86.6
UBC 815 (CT) ₈ G	17	17	100
UBC 824 (TC) ₈ G	10	7	70

UBC 835	(AG) ₈ YC	11	5	45.4
UBC 840	(GA) ₈ YT	11	7	63.6
UBC 842	(GA) ₈ YG	5	4	80
UBC 844	(CT) ₈ RC	11	7	63.6
UBC 845	(CT) ₈ RG	13	10	76.9
UBC 853	(TC) ₈ RT	11	5	45.4
UBC 861	(ACC) ₆	5	4	80
Total		104	88	84.6

注: R=A/T, Y=C/G

2. 结果与分析

2.1 引物的筛选和 ISSR 多态性分析

ISSR 引物是根据 British Columbia 大学公布的序列设计, 由上海生工公司合成。从 50 个引物中选出 12 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应 (表 2), 变性温度根据引物的 T_M 值变化 1-3℃。表 2 结果表明, 筛选的 12 条 ISSR 引物对 17 个香榧品种的扩增, 共扩增出 104 条 DNA 条带, 其中多态性 DNA 条带 88 条, 占总条带的 84.6%。每个引物扩增的 DNA 条带数目在 5-17 之间, 平均 11 条。条带大小在 300-3000bp 之间。引物 UBC815 扩增的 ISSR 产物图谱如图 1。ISSR 扩增产物的 PPB 较高, 说明香榧品种之间的遗传变异较大, 品种资源非常丰富。

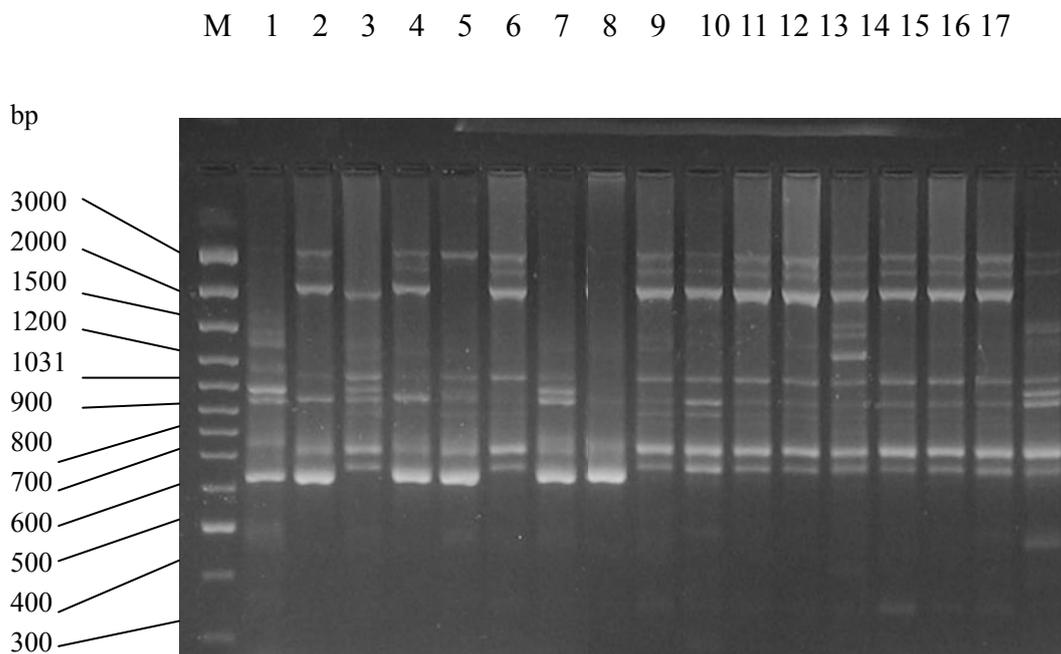


图 1 用 UBC815 对香榧 9 个实生品种和 8 个无性系进行 ISSR-PCR 扩增的带谱。数字为品种代码, M 表示 DNA 标准分子量。

Fig1 ISSR-PCR profiles of 17 *Torreya grandis* Fort individuals using UBC815 primer. Nu stands for cultivar code listed in Table 1, M indicates DNA marker.

2.2 香榧品种间的 ISSR 聚类分析

根据 DNA 扩增结果计算品种间的遗传距离, Nei 遗传距离 (GD) 的范围在 0.021-0.348

之间。其中细榧（优 6）和细榧（优 4）的遗传距离最近（GD=0.021），细榧（优 1）与大圆榧的遗传距离最远（GD=0.348）。基于 Nei 遗传距离，根据 UPGMA 法构建了 17 个香榧品种遗传关系树状图（图 2）。从树状图可以看出，在结合线 L 处，香榧的 9 个实生品种和 8 个无性系被明显地划为两组。第一组包括大圆榧、米榧、旋纹榧、獠牙榧、芝麻榧、落霜榧、象牙榧。第二组包括小圆榧和茄榧还有细榧无性系。细榧无性系和小圆榧、茄榧聚在一组，说明他们之间的亲缘关系较近，很可能细榧这个栽培品种是从小圆榧和茄榧选育出来的，这有待于从 DNA 序列分析的进一步验证。从图中还可以看出，细榧的无性系之间的遗传距离较近，被划为一起，其中细榧（优 2）的遗传距离较其他的无性系品种较远，说明细榧（优 2）在 DNA 水平上较其他无性系品种已有了一定的分化。另外，细榧的 8 个无性系品种都和其他的实生品种的遗传距离较远，说明栽培品种细榧在长期的自然繁殖和人工选育的过程中，在 DNA 水平上同其他的粗榧品种相比变异较大。

关于细榧的起源，本研究结果与任饮良等^[5]的考略结果不同，他们的考略依据为种子的大小、形状、物候期等，认为细榧是起源于芝麻榧的。另外，从聚类结果可以看出，传统的形态学上的分类（圆籽型和长籽型）和本试验的 DNA 分子标记的分类有所不同，与谭晓风等^[4]的研究结果也不符合。我们认为，圆籽型和长籽型只是人为的形态学上的表型性状分类所依据的特征，它并不能反应品种之间的亲缘关系，这与邱英雄等^[3]关于桂花品种分类研究的结果是一致的。

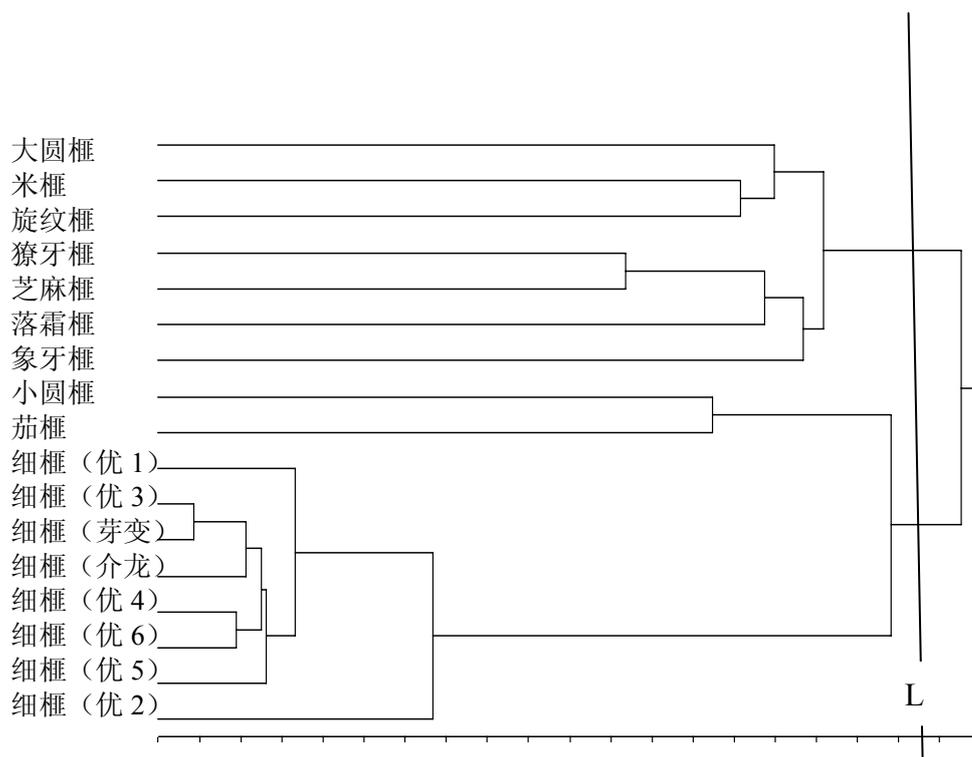


图 2 香榧品种的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图
 Fig. 2 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic distance of trees of *Torreya grandis*

参考文献

1. 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 杨梅不同品种的 ISSR 分析[J]. 农业与生物技术学报, 2002, 10 (4): 343—346
2. 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29 (4): 1—10
3. 邱英雄等. ISSR—PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用[J]. 园艺学报, 2004, 31 (4): 529—532
4. 谭晓凤等. 香榧主要栽培品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29 (1): 69—71
5. 任饮良, 何相忠. 香榧良种——细榧起源考略[J]. 经济林研究, 1998, 16 (1)
6. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183

Studies on genetic diversity in *Torreya grandis* Fort by ISSR

DAI Zheng, Chen Ligeng

Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China (310029)

Abstract

Inter-simple sequence repeat(ISSR) was used to determine the genomic DNA variations and relationships in *Torreya grandis* Fort. Seventeen individuals including 9 cultivars and 8 clonal lines were used in ISSR analysis. A total of 50 ISSR primers were screened, of which 12 polymorphic and informative patterns were selected to determine the genetic diversity and genetic relationships. Total 104 DNA bands were amplified, 88 of which were polymorphic (84.6%). The average number of DNA bands amplified by each primer was 11. A tree diagram was constructed by using UPGMA algorithm. The *Torreya grandis* Fort individuals including 9 cultivars and 8 clones were classified into 2 groups.

Keywords: *Torreya grandis* Fort, ISSR, genetic diversity