

# ISSR-PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用

邱英雄<sup>1</sup> 胡绍庆<sup>2</sup> 陈跃磊<sup>1</sup> 陈晓<sup>1</sup> 吴光洪<sup>3</sup>(<sup>1</sup> 浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; <sup>2</sup> 杭州植物园, 杭州 310013; <sup>3</sup> 杭州桂花品种技术开发有限公司, 杭州 310010)

**摘要:** 利用 ISSR-PCR 方法对桂花的 19 个品种进行了基因组多态性分析, 从 74 个 ISSR 引物中筛选出 13 个多态性引物用于正式扩增, 共扩增出 90 条 DNA 片段, 其中多态性 DNA 条带 79 条, 占总扩增片段的 87.8%, 平均每个引物扩增的 DNA 带的数目为 6.92 条。根据 ISSR 扩增结果, 应用 RAPDistance 软件进行 Nei 相似性系数和遗传距离计算, 利用 UPGMA 法构建聚类树状图。聚类分析的结果把供试桂花的 19 个品种分为 8 个大类, 并对 4 个品种群的遗传关系和种下分类系统进行了探讨。

**关键词:** 桂花; 品种; ISSR; 遗传关系

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0529-04

## Studies on Cultivar Classification of *Osmanthus fragrans* by ISSR-PCR Analysis

Qiu Yingxiong<sup>1</sup>, Hu Shaoqing<sup>2</sup>, Chen Yuelei<sup>1</sup>, Chen Xiao<sup>1</sup>, and Wu Guanghong<sup>3</sup>(<sup>1</sup> College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup> Hangzhou Botanical Garden, Hangzhou 310013, China; <sup>3</sup> Hangzhou Sweet Olive Technology Development Co., Ltd, Hangzhou 310010, China)

**Abstract:** In this study, inter-simple sequence repeat (ISSR) was evaluated for its potential use in the identification of 19 *Osmanthus fragrans* cultivars. 13 out of 74 (18.6%) ISSR primers could generate reproducible polymorphic fragments. The ISSR-PCR assay revealed a total number of 90 DNA bands, of which 79 bands were polymorphic (the percentage of polymorphic bands, PPB = 87.8%). Optimized ISSR primers amplified 4 to 10 bands ranging in size from 300 bp to 2000 bp, with an overall average of 6.92 amplified bands per primer. RAPDistance software was used to calculate the Nei's genetic distance and a dendrogram was constructed based on UPGMA cluster analysis. These 19 *Osmanthus fragrans* cultivars surveyed were classified into eight major groups, and each cultivar in this study could be distinguished from others. The genetic relationship of four cultivars group and classification of *Osmanthus fragrans* were also discussed.

**Key words:** *Osmanthus fragrans*; Cultivars; ISSR; Genetic relationship

## 1 目的、材料与方法

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 原产我国。我国学者把桂花划分为 4 个品种群: 即金桂 (Thunbergii)、银桂 (Odoratus)、丹桂 (Aurantiacus) 和四季桂 (Semperflorens)<sup>[1,2]</sup>。本研究利用 ISSR 分析技术对桂花 4 个品种群的 19 个基本品种 (表 1) 进行研究, 以期对桂花种质资源鉴定和品种 (群) 间亲缘关系研究提供分子水平的证据。

19 个品种取自杭州植物园和杭州满陇桂雨。采集幼嫩叶片, 用硅胶充分干燥。取 0.1 g 用 Fast-prep (Bio101, USA) 粉碎, 采用改良 CTAB 法<sup>[3]</sup>提取总 DNA, 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量, 根据紫外吸收法估计 DNA 的浓度和纯度。ISSR 反应条件经过比较和优化确定为: 25  $\mu$ L 的 PCR 反应液组分和终浓度分别为约 60 ng 模板 DNA, 1.2 U Taq 酶, 1.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>

收稿日期: 2003-09-11; 修回日期: 2004-02-23

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000046806)

dNTPs,  $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物, 2 % 甲酰胺。PCR 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 然后进行 45 个循环:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $52^{\circ}\text{C} \sim 52^{\circ}\text{C}$  复性 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min; 循环结束后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物在含有 EB 的 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳, 以 100 bp Marker (GeneRuler100 ladder, Fermentas UAB, Inc.) 作为标准分子量对照, EPSON (Japan) 紫外自动成像仪照相。扩增位点的命名由所用引物和条带分子量来确定。电泳图谱的每条带 (DNA 片段) 均为一个分子标记 (Marker), 代表一个引物的结合位点。根据各分子标记的迁移率及其有无统计所有的二元数据; 有带 (显性) 记作 1, 无带 (隐性) 记为 0, 强带和弱带均赋值为 1。对于多态位点, 仅在重复试验中能稳定出现的差异带用于数据分析。根据这个二元数据计算多态性位点百分数, 采用 RAPDistance 软件计算品种间的 Nei 遗传距离, 利用 NTSYSpc-1.80 版软件的 UPGMA 分析品种间的遗传关系。

表 1 供试的桂花品种

Table 1 Plant materials used for ISSR analysis in this study

品种群 Group	品种 Cultivar	品种代码 Cultivar Code	品种群 Group	品种 Cultivar	品种代码 Cultivar Code
银桂 <i>Odoratus</i>	早银桂 <i>Zaoyingui</i>	Y01	四季桂 <i>Semperflorens</i>	大叶四季桂 <i>Daye Sijigui</i>	S01
	苏州早黄 <i>Suzhou Zaohuang</i>	Y02		月月桂 <i>Yueyuegui</i>	S02
	宽叶籽银桂 <i>Kuanye Ziyingui</i>	Y03		金桂 <i>Thunbergii</i>	J01
	硬叶银桂 <i>Yingye Yingui</i>	Y04		波叶金桂 <i>Boye Jingui</i>	J02
	白洁 <i>Baijie</i>	Y05		金桂 <i>Jingui</i>	J02
	晚银桂 <i>Wanyingui</i>	Y06		早籽黄 <i>Zaozihuang</i>	J03
丹桂 <i>Aurantiacus</i>	朱砂丹桂 <i>Zhusha Dangui</i>	D01		金狮桂 <i>Jinshigui</i>	J04
	硬叶丹桂 <i>Yingye Dangui</i>	D02		大叶籽金桂 <i>Daye Zijingui</i>	J05
	桃叶丹桂 <i>Taoye Dangui</i>	D03		大叶金桂 <i>Daye Jingui</i>	J06
	小叶丹桂 <i>Xiaoye Dangui</i>	D04			
	丹桂 <i>Dangui</i>	D05			

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选和 ISSR 多态性分析

ISSR 引物由上海生工公司合成。从 74 个引物中筛选出 13 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  $1 \sim 3^{\circ}\text{C}$ 。表 2 结果表明, 所选用的 13 个引物对 19 桂花品种进行正式扩增。共计扩增出 90 条 DNA 条带, 其中多态性 DNA 条带 79 条, 占 87.8 %。每个引物扩增的条带数 4 ~ 10, 平均 6.92 条。扩增出的 DNA 条带大小在 300 ~ 2000 bp 之间。引物 UBC814 扩增的 ISSR 产物图谱如图 1。ISSR 检测到较高的多态性条带比率, 说明了桂花品种间的遗传变异较大。但 13 个 ISSR 引物在 19 个桂花品种中未检测到品种的特异性条带。因此, 目前 ISSR 还不能实际用于桂花品种的鉴定。我们正在对核基因组变异速率较快的 ITS 基因片段进行测序, 以期获得品种特异性变异位点, 用于实际生产中的桂花品种资源鉴定。

表 2 ISSR 引物序列和特异性条带数

Table 2 List of 13 ISSR primers and polymorphic bands obtained in the study

引物 Primer	序列 Sequence	扩增带数 Amplified bands	多态性 DNA 条带 Polymorphic bands	
			带数 No.	%
UBC811	5'-(GA) <sub>8</sub> C-3'	4	4	100.0
UBC814	5'-(CT) <sub>8</sub> A-3'	9	6	66.7
UBC815	5'-(CT) <sub>8</sub> G-3'	10	10	100.0
UBC819	5'-(GT) <sub>8</sub> A-3'	5	4	80.0
UBC823	5'-(TC) <sub>8</sub> C-3'	5	4	80.0
UBC825	5'-(AC) <sub>8</sub> T-3'	8	7	87.5
UBC830	5'-(TG) <sub>8</sub> G-3'	8	8	100.0
UBC841	5'-(GA) <sub>8</sub> YC-3'	7	6	85.7
UBC842	5'-(GA) <sub>8</sub> YG-3'	7	7	100.0
UBC844	5'-(CT) <sub>8</sub> RC-3'	7	7	100.0
UBC845	5'-(CT) <sub>8</sub> RG-3'	7	7	100.0
UBC887	5'-DVD(TC) <sub>7</sub> -3'	6	4	66.7
UBC891	5'-HVH(TG) <sub>7</sub> -3'	7	5	71.4
合计 Total		90	79	87.8

注: Y = C/G, R = A/G, D = A/G/T, V = A/C/G, H = A/C/T

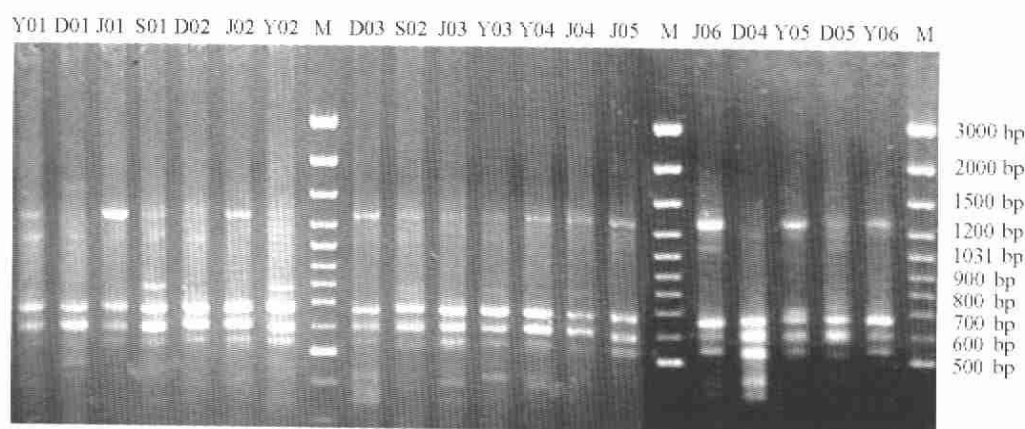


图1 用 UBC814 对 19 个桂花品种进行 ISSR-PCR 扩增的带谱  
数字为品种代码, M 表示 DNA 标准分子量。

Fig. 1 ISSR-PCR profiles of 19 *Osmanthus fragrans* cultivars using UBC814 primer

No. stands for cultivar code listed in Table 1, M indicates DNA marker.

## 2.2 桂花品种间的 ISSR 聚类分析

19 个品种间的遗传距离在 0.167 ~ 0.423 之间, 其中早银桂 (Y01) 和白洁 (Y05) 遗传距离最近 (0.167), 而晚银桂与其他品种群的平均遗传距离最远 (0.342)。从图 2 中可以看出, 19 个品种在  $L = 0.257$  处可分为 8 类。第一类包含银桂品种群的 3 个品种 (Y01、Y05、Y04); 第二类包括金桂品种群 2 个品种 (J03、J06) 和朱砂丹桂 (D01); 第三类含四季桂品种群 2 个品种 (S01、S02) 和银桂品种群的苏州早黄 (Y02); 第四类含银桂、金桂、丹桂品种群各 1 个品种 (Y03、J02 和 D03); 第五类包括丹桂品种群的 2 个品种 (D02、D04) 和金桂品种群 1 个品种 (J01); 第六类含金桂品种群 2 个品种 (J04、J05); 第七类仅包括丹桂 (D05); 第八类为晚银桂 (Y06)。

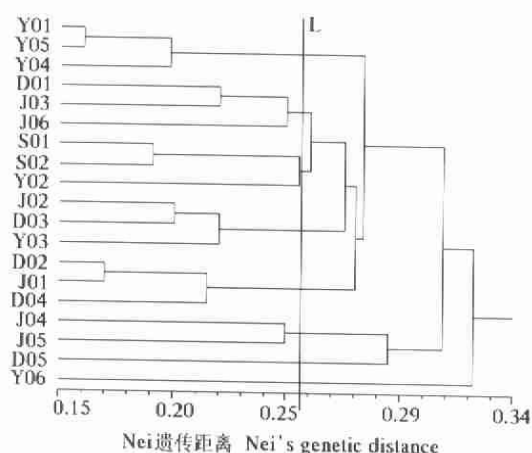


图2 桂花 19 个品种的 ISSR 聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram for 19 *Osmanthus fragrans* cultivars by cluster analysis (UMGMA) based on ISSR markers

由此可见, 除四季桂品种群的 2 个品种 (S01、S02) 外, 其他 3 个品种群的品种都分散到不同的类中。其中, 秋季开花色质较深的金桂品种群和丹桂品种群的多个品种往往聚在一起, 说明它们在 DNA 水平的遗传分化程度较低, 这两个品种群的某些品种间可能有较近的亲缘关系。四季桂品种群的 2 个品种与银桂品种群的苏州早黄亲缘关系较近。秋季开花色质为乳白色的银桂品种群的品种常多个或单个独立聚为几类。银桂品种群的多个品种不仅与其他花色的品种在 DNA 水平出现了较大程度的分化, 而且银桂品种群内的多个品种之间的遗传变异程度也较高, 因此银桂花色性状的人工选育时间很可能较早。从 ISSR 聚类分析的结果可以看出, 花色只是人为分类所依据的特征, 并不能反映品种群间的亲缘关系, 4 个品种群并不是自然的分类群, 只是人为分类的品种群, 但具有一定的实用性。色质较深的金桂某些品种和丹桂某些品种间存在很近的亲缘关系, 也表明了朱长山等根据色质对品种进行划分具有一定的合理性<sup>[1]</sup>。陈建业等人根据同功酶分析结果, 认为银桂类和四季桂类的品种间有较近的亲缘关系, 并将二者合并称“银桂品种群”, 下设银桂型和四季桂型<sup>[4]</sup>。本试验结果仅

表明四季桂的 2 个品种与银桂品种群的苏州早黄亲缘关系较近, 而与银桂品种群的其他品种的遗传关系较远, 因此本研究不支持将两个品种群进行合并。根据试验结果, 我们也认为 Green 等将金桂、银桂、丹桂和四季桂定为变种或变型<sup>[1,5]</sup>均不妥。

#### 参考文献:

- 1 朱长山, 李瑞符, 袁建都, 等. 河南桂花品种的分类研究. 河南农业大学学报, 1992, 26 (2): 194 ~ 201
- 2 刘玉莲. 桂花品种分类及木犀属种质资源的利用. 植物资源与环境, 1993, 2 (2): 44 ~ 48
- 3 Doyle J J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In: Hewitt G M, Johnston A. Molecular techniques in taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1991. 283 ~ 293
- 4 陈建业, 宁玉霞, 赵翠花, 等. 河南桂花品种过氧化物酶同工酶研究. 园艺学报, 1995, 22 (2): 176 ~ 180
- 5 Green P S. A monographic revision of *Osmanthus* in Asia and America. Notes Roy. Bot. Gard. Edinb., 1958, 22 (5): 435 ~ 542

## 间歇浸没式生物反应器在辰星草培养苗扩繁中的应用

廉美兰 朴炫春 王 颖 赵长新 金 花 (延边大学农学院园艺系, 龙井 133400)

### Application of Ebb and Flood Bioreactor System in Multiplication of *Statice*

Lian Meilan, Piao Xuanchun, Wang Ying, Zhao Changxin, and Jin Hua

(Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China)

**关键词:** 辰星草; 间歇浸没式反应器; 组织培养

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 04-0532-01

以茎尖培养得到的辰星草 (*Limonium hybrid 'Misty Blue'*) 培养苗 (带 2 叶片) 为试材。培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 调节为 5.8。固体培养和振荡培养使用 250 mL 三角瓶, 每瓶 100 mL 培养基。生物反应器培养使用 5 L 气球型反应器, 2 L 培养基。完全浸没式生物反应器培养时, 无“载桥”, 培养苗在培养基中始终处于浸泡状态; 间歇浸没式生物反应器培养时, 离反应器底部 15 cm 处架有“载桥”, 培养基定时与“载桥”上的苗接触, 每天 4 次 (每隔 5 h 供给 1 h)、8 次 (每隔 2 h 供给 1 h) 和 12 次 (每隔 1 h 供给 1 h)。生物反应器培养的空气注入量均为 0.1 vvm (air volume/culture volume/min)。温度 (24 ± 2) °C、光照 1600 lx, 16 h/d, 培养 4 周。每个处理重复 3 次。

试验结果表明, 间歇浸没式生物反应器培养过程中, 培养苗在培养基供给次数适宜时, 分化大量的丛生苗, 生长旺盛, 丛生苗叶色深绿。相比之下, 同样是利用液态培养基培养的振荡培养和完全浸没式反应器培养苗几乎不生长, 叶片黑绿, 组织发脆, 失去使用价值, 且其生长及分化不及传统的固体培养。间歇浸没式反应器培养中, 每天供给培养基 8 次有利于培养苗生长和分化, 其鲜样和干样质量明显优于每天供给培养基 4 次和 12 次的处理, 且分化的丛生苗数最多 (表 1)。间歇浸没式反应器培养和固体培养的苗干物率较其它两种完全浸没培养法高。生物反应器培养中, 培养苗在培养基中的浸泡时间非常重要, 浸泡时间过短培养苗不能吸收充足的营养, 且有失水现象; 过长则由于幼苗久处无氧状态, 影响呼吸, 同时组织发生膨胀、玻璃化等现象。

表 1 不同培养条件下辰星草增殖及生长的比较

Table 1 Comparison of multiplication and growth of shoot in *statice* at different culture conditions

培养方法 Culture methods	培养基供给次数 Medium supply (No./day)	接种外植体数 No. of explants /vessel	丛生苗数 No. of adventitious shoots		质量 Mass (mg/explant)		干物率 Dry matter (%)
			(No./explant)	(No./vessel)	鲜样 Fresh	干样 Dry	
固体培养 Solid culture	—	8	18.7 c	149.6 d	1586.6 c	184.0 c	11.6 a
振荡培养 Agitated culture	—	8	1.2 e	9.6 e	262.1 e	23.6 d	9.0 b
完全浸没式反应器 Immersion bioreactor	—	50	2.3 e	115.0 d	336.2 d	31.3 d	9.3 b
间歇浸没式反应器 Ebb and flood bioreactor	4	50	5.4 d	270.0 c	378.0 d	41.2 d	10.9 a
	8	50	33.0 a	1649.8 a	2532.2 a	267.8 a	11.0 a
	12	50	25.0 b	1250.2 b	1924.1 b	211.7 b	11.0 a