

香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析

戴正^{1,2}, 陈力耕^{1*}, 童品璋³

(¹ 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; ² 青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109; ³ 浙江省诸暨市林业局, 浙江诸暨 311800)

摘要: 利用 ISSR 方法对香榧本地 9 个实生品种和 8 个优良无性系的遗传变异和品种间的遗传关系进行了分析, 从 50 个随机引物中筛选出 12 条多态性引物用于正式扩增, 共扩增出 104 个 DNA 片段, 其中 88 个片段为多态性扩增片段, 占总扩增片段的 84.6%。根据 ISSR 引物的扩增图谱, 确定部分供试品种的特异条带。基于 Nei's 遗传距离分析, 利用 UPGMA 法构建了分子树状图。聚类结果把供试的香榧 9 个实生品种和 8 个优良无性系分为两大组, 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、茄榧和细榧优良无性系。

关键词: 香榧; ISSR; 遗传变异; 遗传关系

中图分类号: S 664.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 08-1125-06

Genetic Variation and Fingerprinting of *Torreya grandis* Cultivars Detected by ISSR Markers

DAI Zheng^{1,2}, CHEN Li-geng^{1*}, and TONG Pin-zhang³

(¹ Agriculture and Bio-technology College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ² College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ³ Forestry Bureau of Zhuji City, Zhuji, Zhejiang 311800, China)

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 elite clones were used in ISSR analysis. Of the 50 ISSR primers subjected to screening, 12 produced reproducible, polymorphic and disc-repant fragments. Using these primers, 104 DNA bands were amplified, of which 84.6% were polymorphic. The average number of DNA bands amplified by each primer was 11. DNA profiles based on ISSRs have revealed potential diagnostic for various individual accessions. A dendrogram generated using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average based on Nei's distance showed that the *Torreya grandis* cultivars were clustered into two groups. The first group included Dayuanfei, Mifei, Xuanwenfei, Liaoyafei, Zhimafei, Luoshuangfei and Xiangyafei, the second group included Xiaoyuanfei, Qiefei and the clone cultivars of *Torreya grandis* 'Merrillii'.

Key words: *Torreya grandis* Fort.; ISSR; genetic variation; genetic relationship

榧树 (*Torreya grandis* Fort. ex Lindl.) 是裸子植物红豆杉科 (Taxaceae) 榧属的第三纪孑遗植物, 为国家二级保护树种 (孟鸿飞等, 2003)。香榧 (*Torreya grandis* 'Merrillii') 是榧树中的优良变异经人工选育后嫁接繁殖栽培的优良品种, 是我国珍贵的干果果树, 具有食用、药用、材用、绿化等多种用途。在香榧 1300 多年的栽培历史中, 由于多采用实生繁殖, 产生了丰富的变异类型, 人们选育出了多个品种, 其中以细榧的品质最佳, 著名的枫桥香榧和市场上供应的香榧均为细榧类型。浙

收稿日期: 2008-04-08; 修回日期: 2008-06-11

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20030335118)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lgchen@zju.edu.cn)

江省诸暨市林业局通过近 20 年优株选育和大批量繁殖试验,并经过新类型的比较,从中选育出 8 个细榧的优良无性系。多年来,我国学者在形态学研究的基础上提出了香榧品种的不同分类系统(马正三,1982;刘权等,1993;康宁和汤仲坝,1995)。20 世纪 90 年代以后,将 RAPD 技术应用于香榧品种分类的研究已有报道(谭晓风等,2002)。ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记(Zietkiewicz et al., 1994)在果树种质鉴定、亲缘关系分析、遗传图谱的构建和种质资源的遗传多样性研究中得到了广泛应用(Fang et al., 1998; Eiadthong et al., 1999; Luisa et al., 2001; Sankar & Moore, 2001; 邱英雄等, 2004; 张青林和罗正荣, 2004)。本研究利用 ISSR 分子标记技术对香榧的 9 个实生品种和细榧的 8 个优良无性系进行了遗传变异的研究,旨在为科学准确地区分品种、品系、类型,揭示其起源、演化关系,为香榧优良种质资源鉴定提供可靠的分子水平的依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及其 DNA 提取

9 个实生品种和 8 个无性系当年生幼叶(图 4)均采自浙江省诸暨市林业局香榧品种资源圃。

采用改良的 CTAB 法(Doyle, 1991)提取香榧的总 DNA,用 1.0% 的琼脂糖电泳检测, DNA 的浓度和纯度通过紫外分光光度计测定。

1.2 ISSR 反应的条件和扩增程序

采用 Mastercycler Gradient PCR 仪(Eppendorf)进行 ISSR-PCR 扩增反应。经过比较和优化确定 25 μL 的 PCR 反应液含有的组分和终浓度为:约 60 ng 模板 DNA, 1.2 U *Taq* 酶, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 45 个循环; 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 DNA 标准物对照, EPSON (Japan) 紫外自动成像仪照相。位点的命名由所用引物和条带大小来确定。

1.3 扩增产物和差异带的分析方法

电泳图谱每一条带(DNA 片段)均为一个分子标记,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二元数据;有带(显性)记作 1,无带(隐性)记为 0,强带和弱带的赋值均为 1。对于多态位点,仅在重复试验中稳定出现的差异带用于数据分析。根据这个二元数据矩阵,采用 Popgene 软件(Yeh et al., 1997)计算多态性条带比率(PPB)、观测等位基因数(A_o)、有效等位基因数(A_e)、Nei's 基因多样性(H_e)、Nei's 遗传距离(D)、Shannon 信息指数(H_o)。基于 Nei's 遗传距离,利用 NTSYSpc-1.80 版软件的 UPGMA 分析品种间遗传关系。

2 结果与分析

2.1 PCR 条件优化及 ISSR 的引物筛选

ISSR 引物是根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。从 50 个引物中选出 12 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的用于 ISSR-PCR 反应(表 1),变性温度根据引物的 T_m 值变化 1~3 $^{\circ}\text{C}$ 。

在其他反应条件不变的情况下,研究 25 μL 反应体积中模版 DNA 用量在 100、80、70、60、50、40、30、20、10 ng 时 ISSR 扩增的结果。从图 1 可以看出,当 DNA 用量为 60 ng 时,扩增的条带多并且最清晰;而 DNA 用量过多或者过少时,则 DNA 条带少且不清晰。

表 1 ISSR 引物序列和多态性条带数

Table 1 List of 12 ISSR primers and polymorphic bands obtained in the study

| 引物 Primer | 序列 * Sequence | 统计条带数 Number of bands | 多态性条带 Polymorphic bands | | |
|--------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|--------|-------|
| | | | 数量 Number | Number | % |
| UBC 808 | (AG) ₈ C | 6 | 6 | | 100.0 |
| UBC 812 | (GA) ₈ A | 5 | 3 | | 60.0 |
| UBC 813 | (CT) ₈ T | 15 | 13 | | 86.6 |
| UBC 815 | (CT) ₈ G | 17 | 17 | | 100.0 |
| UBC 824 | (TC) ₈ G | 10 | 7 | | 70.0 |
| 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 | | 80.0 |
| 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 | | 80.0 |
| 总计 Total | | 104 | 88 | | 84.6 |

* R = A / T; Y = C / G.

图 2 为基因组 DNA 的电泳结果, 经紫外分光光度计检测纯度均适合于 ISSR-PCR 扩增反应。

2.2 ISSR 扩增结果

表 1 结果表明, 筛选的 12 条 ISSR 引物对 17 个香榧品种扩增, 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%。本研究引物扩增的所有条带能够区分供试香榧的所有品种。每个引物扩增的 DNA 条带数在 5 ~ 17 之间, 平均 11 条。条带大小在 300 ~ 3 000 bp 之间。引物 UBC 815 扩增的 ISSR 产物图谱如图 3。

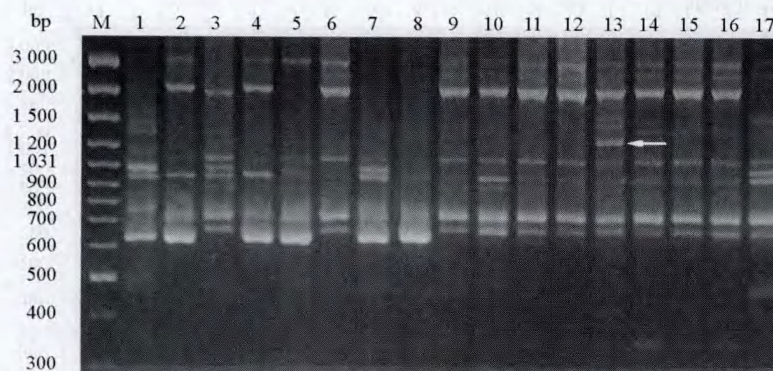


图 3 用 UBC 815 对香榧 9 个实生品种和 8 个优良无性系进行 ISSR-PCR 扩增的谱带
1 ~ 17 为品种代号详见图 4, M 表示 DNA 标准分子量, 箭头表示品种特异性扩增条带。

Fig. 3 ISSR-PCR profiles of 17 *Torreya grandis* Fort. individuals using UBC 815 primer

1 ~ 17 stand for cultivar code listed in Fig. 4; M indicates DNA marker;

The band marked with arrow is the cultivar-specific.



图 1 DNA 浓度梯度对 ISSR 反应的影响

1 ~ 9 模板 DNA 的用量分别为: 100、80、70、60、50、40、30、20、10 ng 扩增的 ISSR 产物。

引物为 UBC 853, 品种为旋纹榧。

Fig. 1 Effects of DNA concentration on ISSR reaction

No. 1 ~ 9 are the products amplified by 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ng of template DNA respectively

(UBC 853, Xuanwenfei).

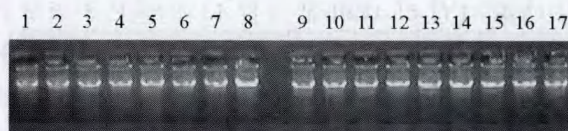


图 2 香榧 17 个样品的基因组 DNA 的电泳结果

1 ~ 17 数字为品种代码, 详见图 4。

Fig. 2 The electrophoresis result of total DNA of 17

Torreya grandis Fort. individuals

1 ~ 17 stand for cultivar code listed in Fig. 4.

本研究发现, 3'端锚定一个碱基的 ISSR 引物 (如 UBC 808、UBC 812、UBC 813、UBC 815、UBC 824) 扩增样本 DNA 的多态性位点百分率平均为 83.32%, 而锚定两个碱基的引物 (如 UBC 835、UBC 840、UBC 842、UBC 844、UBC 845、UBC 853) 扩增样本 DNA 的为 62.48%。

2.3 香榧品种遗传变异分析

本试验的 Popgene 分析结果表明, 17 个香榧品种的 Nei's 基因多样性 (H_e) 为 0.2353; Shannon 多态性信息指数 (H_o) 为 0.3541; 观测等位基因数 (A_o) 为 1.7333, 有效等位基因数 (A_e) 为 1.4057, 多态性条带比率 (PPB) 为 84.6%。说明香榧品种之间的遗传变异较大, 品种资源非常丰富。

2.4 香榧品种的 DNA 指纹图谱

通过对香榧 9 个品种和 8 个优良无性系的扩增图谱分析, 检测到两个品种和两个优良无性系的特异性条带。这些特异性条带分别是: 引物 UBC 812 扩增的细榧 (优1) 的 1 300 bp 左右的特异性条带; 引物 UBC 815 扩增的细榧 (优5) 的 1 200 bp 左右的特异性条带; 引物 UBC 865 扩增的大圆榧的 600 bp 左右的特异性条带; 引物 UBC 865 扩增的茄榧的 800 bp 左右的特异性条带。以上这些指纹图谱的特征条带可以用于香榧品种间鉴定的分子依据。

2.5 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's 遗传距离 (D) 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 ($D=0.021$), 细榧 (优1) 与大圆榧的遗传距离最远 ($D=0.348$)。基于 Nei's 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 4)。从树状图可以看出, 在结合线 L 处, 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、落霜榧和象牙榧。第二组包括小圆榧和茄榧, 还有细榧优良无性系。

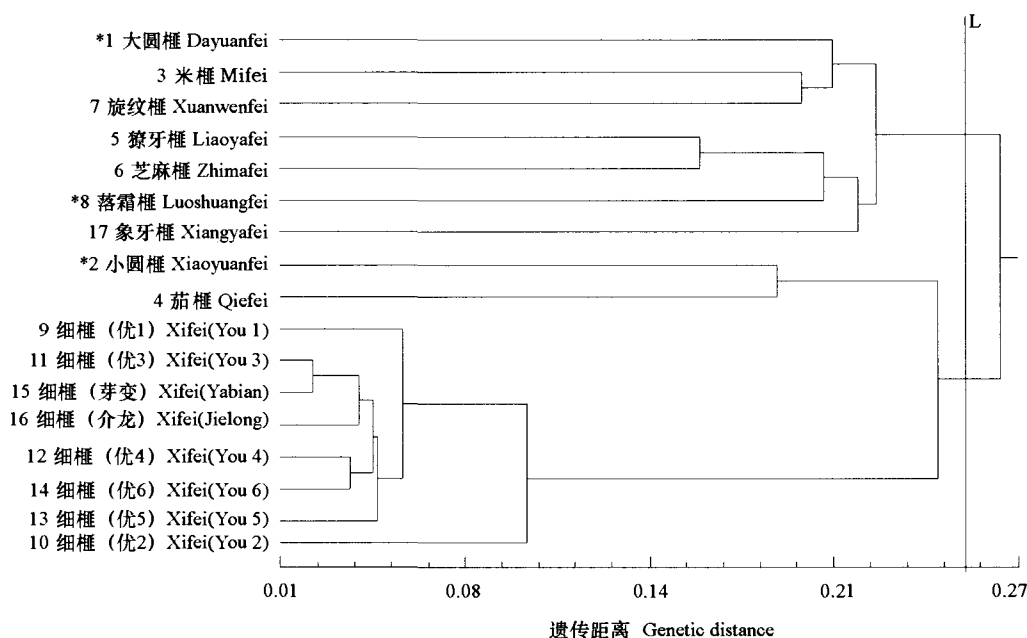


图 4 香榧品种的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图

1~17 为品种代码; * 种子形状为圆形, 其余的为长形。

Fig. 4 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic distance of trees of *Torreya grandis*

No. 1~17 stand for cultivar code; * Seed shape is circular, the rest are long.

3 讨论

基因组中的 SSR 一般为 2~6 个寡聚核苷酸, 用于 ISSR 的引物常为 5' 或 3' 端锚定的二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸重复序列, 重复次数一般为 4~8 次, 使引物的总长度达到 20 bp 左右。5' 或 3' 端用于锚定的碱基数目一般为 1~4 个, 锚定的目的是引起特定位点退火, 使引物与相匹配 SSR 的一端结合, 而不是中间, 从而对基因组中特定片段进行扩增和检测 (邹喻苹 等, 2001)。袁建国等 (2005) 在百山祖冷杉 ISSR 遗传多样性的研究中发现扩增结果与引物序列和加锚位置有密切关系, 3' 端锚定两个碱基的引物比锚定一个碱基的引物扩增产物的多态性要高。本试验中发现, 锚定于 3' 端一个碱基的引物扩增产物的多态性相对较高, 如引物 UBC 808、UBC 812、UBC 813、UBC 815、UBC 824 扩增样本 DNA 的多态性位点百分率平均为 83.32%; 而锚定两个碱基的引物扩增产物的多态性相对较低, 如引物 UBC 835、UBC 840、UBC 842、UBC 844、UBC 845、UBC 853 扩增样本 DNA 的多态性位点百分率平均为 62.48%。说明在 3' 端锚定一个碱基的引物比较适合香榧品种遗传变异的 ISSR 检测。

本结果与其他裸子植物的 ISSR 或 RAPD 数据进行比较, 表明香榧的遗传多样性 ($PPB = 84.6\%$) 比银杏 (葛永奇 等, 2003) ($PPB = 52.27\%$)、水杉 (李晓东 等, 2003) ($PPB = 38.62\%$) 和银杉 (汪小全 等, 1996) ($PPB = 32\%$) 的自然群体的遗传多样性高得多。说明香榧经过 1 300 多年的实生繁殖和人工选育, 产生了较高的遗传变异, 品种资源比较丰富, 这对香榧优良品种的选育是极为有利的。

从香榧品种遗传关系树状图可以看出, 细榧的优良无性系之间的遗传距离较近, 被划为一组, 其中细榧 (优 2) 与其他的无性系品种的遗传距离较远, 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 个优良无性系品种都和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。

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) 以及谭晓风等 (2002) 的研究结果都和本试验的 DNA 分子标记的分类结果完全不同。尽管谭晓风等的分类结果和传统形态学上的分类结果基本吻合, 但 UPGMA 的分类结果也表明, 形态学上属于长榧的茄榧、旋纹榧同形态学上属于圆榧的聚在了一组。本试验结果显示, 传统形态学上属于圆榧的小圆榧和传统形态学上属于长榧的细榧优良无性系以及茄榧聚在一组, 而原来形态学上属于长榧的米榧、旋纹榧、獠牙榧、芝麻榧、象牙榧却和形态学上属于圆榧的大圆榧、落霜榧聚在一组, 这一分类结果完全打破了传统形态学上根据种子表型性状来分类的结果。分子聚类结果不同于形态学分类这一现象可能是由于引种交流导致了某些地区品种基因在不同地区种质间的渗入, 可能与基因漂移现象有关。

本试验检测到香榧两个实生品种和细榧两个优良无性系的特异性条带, 可作为实际生产中香榧品种鉴定的分子依据。

References

- Ai Jian-guo, Qiu Ying-xiong, Yu Jiu-hua, Chen Xiao-rong, Ding Bing-yang. 2005. Optimization of inter simple sequence repeats (ISSR) analysis as applied to preliminary study of genetic variation in *Abies beshanzuensis*. Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci, 31 (3): 277-282. (in Chinese)
- 袁建国, 邱英雄, 余久华, 陈小荣, 丁炳扬. 2005. 百山祖冷杉的 ISSR 分析优化和遗传多样性初步研究. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 31 (3): 277-282.
- Doyle J J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation // Hewitt G M, Johnston A. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer-Verlag: 283-293.
- Eiadthong W, Yonemori K, Sugiura A. 1999. Identification mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat- (SSR-) anchored primers. Sci Hort, 82: 57-66.

- Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J Amer Soc Hort Sci*, 123 (4): 612–617.
- Ge Yong-qi, Qiu Ying-xiong, Ding Bing-yang, Fu Cheng-xin. 2003. ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*. *Biodiversity Science*, 28 (7): 598–602. (in Chinese)
- 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 傅承新. 2003. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. *生物多样性*, 28 (7): 598–602.
- Kang Ning, Tang Zhong-xun. 1995. Studies on the taxonomy of the genus *Torreya*. *Bulletin of Botanical Research*, 15 (3): 349–362. (in Chinese)
- 康 宁, 汤仲埧. 1995. 榧属分类学研究. *植物研究*, 15 (3): 349–362.
- Li Xiao-dong, Huang Hong-wen, Li Jian-qiang. 2003. Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides*. *Biodiversity Science*, 11 (2): 100–108. (in Chinese)
- 李晓东, 黄宏文, 李建强. 2003. 孑遗植物水杉的遗传多样性研究. *生物多样性*, 11 (2): 100–108.
- Liu Quan, Liu Hai, Xiao Ying-lin. 1993. Studies on numerical classification of Chinese *Torreya* germplasm resource. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 19 (2): 129–134. (in Chinese)
- 刘 权, 刘 海, 肖映林. 1993. 香榧的种质资源数量分类的研究. *浙江农业大学学报*, 19 (2): 129–134.
- Luisa M C, Luis G, Cristina O. 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J Amer Soc Hort*, 126 (5): 517–522.
- Ma Zheng-san. 1982. Preliminary researches on the taxonomy of *Torreya* cultivars. *Subtropical Forestry Science and Technology*, (2): 41–43. (in Chinese)
- 马正三. 1982. 香榧品种分类初步意见. *亚林科技*, (2): 41–43.
- Meng Hong-fei, Jin Guo-long, Weng Zhong-yuan. 2003. Investigation on the ancient *Torreya grandis* trees in Zhuji City. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 20 (2): 134–136. (in Chinese)
- 孟鸿飞, 金国龙, 翁仲源. 2003. 诸暨市香榧古树资源调查. *浙江林学院学报*, 20 (2): 134–136.
- Qiu Ying-xiong, Hu Shao-qing, Chen Yue-lei, Chen Xiao, Wu Guang-hong. 2004. Studies on cultivar classification of *Osmanthus fragran* by ISSR-PCR analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 529–532. (in Chinese)
- 邱英雄, 胡绍庆, 陈跃磊, 陈 晓, 吴光洪. 2004. ISSR-PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用. *园艺学报*, 31 (4): 529–532.
- Sankar A A, Moore G A. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet*, 102: 206–214.
- Tan Xiao-feng, Hu Fang-ming, Zhang Dang-quan, Zhou Xu-hui, Yang Wei. 2002. Molecular identification of main cultivars of *Torreya grandis* by RAPD markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (1): 69–71. (in Chinese)
- 谭晓风, 胡芳名, 张党权, 周煦惠, 杨 伟. 2002. 香榧主要栽培品种的 RAPD 分析. *园艺学报*, 29 (1): 69–71.
- Wang Xiao-quan, Zou Yu-ping, Zhang Da-ming, Hong De-yuan, Liu Zheng-yu. 1996. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla*. *Science in China: Ser C*, 26 (5): 436–441. (in Chinese)
- 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 洪德元, 刘正宇. 1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. *中国科学: C 辑*, 26 (5): 436–441.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, Ye Z H, Mao J X. 1997. Popgene, the user friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada*.
- Zhang Qing-lin, Luo Zheng-rong. 2004. ISSR technology and its applications in fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 21 (1): 54–58. (in Chinese)
- 张青林, 罗正荣. 2004. ISSR 及其在果树上的应用. *果树学报*, 21 (1): 54–58.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.
- Zou Yu-ping, Ge Song, Wang Xiao-dong. 2001. *Molecular markers of systematic & evolutionary botany*. Beijing: Science Press: 36–97. (in Chinese)
- 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社: 36–97.