

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.004

梅洛银, 廖明安, 任雅君, 等. 基于 ISSR 分子标记的枇杷材料亲缘关系分析[J]. 广西植物, 2013, 33(6):740—744

Mei LY, Liao MA, Ren YJ, et al. Relationship identification of a loquat variant based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)[J]. *Guihaia*, 2013, 33(6):740—744

# 基于 ISSR 分子标记的枇杷材料亲缘关系分析

梅洛银<sup>1</sup>, 廖明安<sup>1\*</sup>, 任雅君<sup>2</sup>, 罗丽<sup>1</sup>, 程籍<sup>1</sup>, 刘娟<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学园艺学院, 四川雅安 625014; 2. 四川农业大学风景园林学院, 四川雅安 625014)

**摘要:** 为了判断川早枇杷与其他枇杷材料间的亲缘关系, 探讨 ISSR 分析鉴定枇杷变异的有效性。以川早枇杷等 13 份枇杷品种(品系)为材料, 通过 DNA 提取、ISSR-PCR 反应体系建立、引物筛选及 PCR 扩增, 使用 Quantity One 软件对扩增条带进行统计分析, 计算遗传相似系数, 并进行 UPGMA 聚类分析。结果表明: 用 14 条 ISSR 引物进行扩增, 共获得 165 条带, 条带长度为 300~1 500 bp; 日本茂木与川早枇杷的遗传相似系数最高, 为 0.7920, 早钟六号和晚钟与川早枇杷的遗传相似系数分别为 0.7717 和 0.7444, 当遗传相似系数为 0.7160 时, 13 份枇杷材料可以被分为 4 类。因此, 相对于早钟六号, 川早枇杷材料在遗传物质上发生了变异, 具备成为枇杷新品种的条件。

**关键词:** 川早枇杷; ISSR-PCR; 变异; 亲缘关系

**中图分类号:** S667.3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-3142(2013)06-0740-05

## Relationship identification of a loquat variant based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

MEI Luo-Yin<sup>1</sup>, LIAO Ming-An<sup>1\*</sup>, REN Ya-Jun<sup>2</sup>,LUO Li<sup>1</sup>, CHENG Ji<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>

(1. College of horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** This research was aimed at analyzing the special early character of 13 loquats, including Chuanzao loquat, and the possibility of judging loquat variation by ISSR, which was a new bud mutant line. To make UPGMA (Unweighted Pairgroup Method and Arithmetic Average) analysis and calculate genetic similarity, 13 loquats were used as materials to extract total DNA, Optimize ISSR System, screen primer and PCR, and detected bands with Quantity One (a software). With 14 ISSR primers, 165 bands were found, the length of which was 300—1 500 bp; the genetic similarity between Chuanzao loquat and Maomu was 0.7920, the genetic similarity between Chuanzao loquat, Zaozhong 6 and Wanzhong were 0.7717 and 0.7444 respectively. 13 loquats could be separated into 4 species when the genetic similarity was 0.7160. The Chuanzao loquat showed genetic changes, which meant it could be a new variety.

**Key words:** Chuanzao loquat; ISSR-PCR; variation; genetic relationship

枇杷 (*Eriobotrya* spp.) 原产我国, 是我国南方特有果树, 又名芦橘、金丸, 具有极高的营养价值和经济价值(叶静渊, 1988)。我国枇杷种质资源非常

丰富, 种类繁多。章恢志(1996)曾对枇杷属植物十几个种类的分布做了初步介绍, 认为枇杷属植物共有 30 种, 分布在亚洲的温带和亚热带地区; 共有 15

收稿日期: 2013-03-15   修回日期: 2013-05-07

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2F000006)

作者简介: 梅洛银(1988-), 男, 四川眉山人, 硕士, 研究方向为果树种质资源与遗传育种, (E-mail)396076520@qq.com。

\*通讯作者: 廖明安, 博士, 教授, 研究方向为果树生理生态及栽培, (E-mail)57590159@qq.com。

个种类,包括普通枇杷、麻栗坡枇杷、栎叶枇杷、腾越枇杷、怒江枇杷、香花枇杷、齿叶枇杷、倒卵叶枇杷、南亚枇杷、大花枇杷、台湾枇杷、窄叶枇杷、小叶枇杷,以及在西藏墨脱发现的椭圆叶枇杷和汉源、石棉发现的大渡河枇杷。

果树品种鉴定的传统方法主要有植物形态鉴定法、花粉电镜扫描法、同工酶法以及染色体核型分析法(廖振坤等,2006)。ISSR 作为一种分子标记技术,其引物为重复序列。由于重复序列在基因组中是变异最快的成分,较少受自然选择影响,故其变异容易保留,重复区域的多态性远高于其他区域(张青林等,2004)。枇杷从幼树到成年结果一般需要 2~3 年时间,采用分子标记对枇杷变异品系 DNA 片段所产生的扩增产物进行多态性分析,就可在早期从分子水平鉴定突变体为饰变还是遗传变异。近年来,学者通过 SSR、SRAP 以及 RAPD 等分子标记技术对枇杷种质资源遗传多样性及遗传关系(胡文舜等,2010;仲艳,2010;董燕妮,2008)进行了分析,但对于 ISSR 在枇杷变异鉴定方面,尚未见相关报道。川早枇杷是从福建引进的早钟六号品种产生的一个芽变品系,2008 年发现于四川省雅安市汉源县,其表现出“特早熟”的特性。在雅安市栽培,其果实成熟期为 12 月至翌年 1 月,比早钟六号提前 2~3 个月,单果重 50~80 g,三年生树亩产 250 kg,具有非常高的经济价值(Mei *et al.*, 2012)。为此,本研究通过 ISSR 分子标记对川早枇杷等 13 个品种(品系)进行鉴定,旨在判断川早枇杷与解放钟、早钟六号等 13 份枇杷材料间的亲缘关系,并探讨 ISSR 分析鉴定枇杷变异的有效性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取完整、无病虫害的枇杷幼嫩叶片为材料提取基因组 DNA,相关枇杷材料及取样信息见表 1。Taq DNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、PCR-buffer 及 100 条 ISSR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物序列参考哥伦比亚大学提供的 100 条引物。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及检测 基因组 DNA 提取参照刘月学(2005)的 CATB-蛋白酶 K 法。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用核酸蛋白检测仪测定 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 及 DNA 浓度和纯度,将

表 1 ISSR-PCR 材料来源

Table 1 Source of materials for ISSR-PCR

样品编号 Sample number	样品名称 Sample name	采样地点 Sampling location	采样时间 Sampling Date
1	解放钟	龙泉驿区柏合镇	2012.4.9
2	大五星	龙泉驿区柏合镇	2012.4.9
3	软条白沙	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
4	晚钟	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
5	白梨	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
6	香钟	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
7	贵妃	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
8	早钟 6 号	龙泉驿区柏合镇	2012.4.9
9	朝天果	龙泉驿区柏合镇	2012.4.9
10	龙泉 1 号	龙泉驿区柏合镇	2012.4.9
11	川早枇杷	雅安市汉源县	2012.3.24
12	黄丰	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9
13	茂木	四川省农科院枇杷良种繁育基地	2012.4.9

各样本 DNA 浓度调整为 10 ng · μL<sup>-1</sup>,置于 -20℃ 冰箱备用。

1.2.2 引物筛选及 PCR 扩增 通过建立好的 PCR 反应体系,从 100 条 ISSR 引物中筛选出 DNA 条带清晰,多态性高的引物用于 PCR 扩增。扩增程序为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 70 s,72℃ 延伸 1.5 min,40 个循环,72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖电泳,EB 染色,并拍照记录。

1.2.3 数据分析 采用 Quantity One 软件对扩增出的谱带进行统计分析,根据二元性编码,即在同一位置条带出现用“1”表示,缺失以“0”表示,建立“0-1”数据矩阵。根据“0-1”矩阵,用 NTSYS-PC2.1 软件计算遗传相似系数,并对 13 个枇杷材料进行 UPG-MA 聚类分析。

相似性系数采用 Dice 系数,计算公式:  $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。其中  $S_{ij}$  为材料  $i$  和材料  $j$  的相似系数, $N_{ij}$  是材料  $i$  和  $j$  共有的条带数, $N_i$  和  $N_j$  分别是  $i$  和  $j$  各自的条带数(Yang *et al.*, 1993)。

## 2 研究结果

### 2.1 ISSR 引物多态性分析

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条进行扩增,共获得 165 条带,平均每条引物扩增出 11.8 条条

带,其中多态性条带 108 条,多态性百分率为 65.45%(表 2),条带长度为 300~1 500 bp。引物 UBC895 扩增出 17 条多态性条带,多态性达 100%。

个别引物能够扩增出特异条带,如相对于早钟 6 号,UBC850 能够在其变异品系川早枇杷中扩增出一条 540 bp 的特异条带(图 1)。

表 2 14 条 ISSR 引物扩增多态性

Table 2 Bands amplified by 14 ISSR primers

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	总条带数 Amplified band No.	多态性条带数 Polymorphic band No.	多态性百分率(%) Percentage of polymorphic band
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAT	12	4	33.33
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	8	3	37.50
UBC873	GACAGACAGACAGACA	10	7	70.00
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAC	9	5	55.56
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	9	5	55.56
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGGCTT	8	6	75.00
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGGCTA	12	5	41.67
UBC855	ACACACACACACACCTT	11	5	45.46
UBC895	AGAGTTGGTAGCTTTGATC	17	17	100.00
UBC847	CACACACACACACAAGC	16	11	68.75
UBC848	CACACACACACACAAGG	17	15	88.24
UBC850	GTGTGTGTGTGTGTCTC	13	5	38.46
UBC857	ACACACACACACACCTG	13	12	92.31
UBC899	CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA	10	8	80.00
总计	Total	165	108	65.45

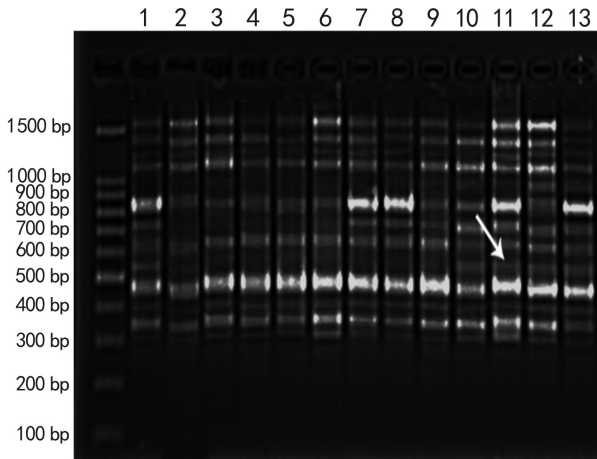


图 1 引物 UBC850 对 13 份枇杷材料 ISSR-PCR 扩增条带  
Fig. 1 Bands of 13 loquat amplified by primer UBC850

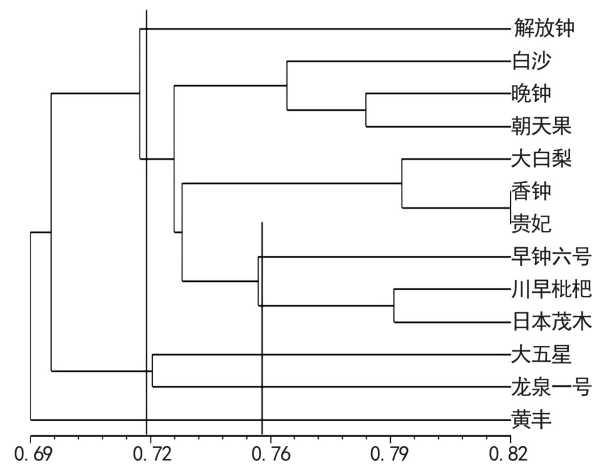


图 2 基于 ISSR 分析的 13 份枇杷材料 UPGMA 聚类分析  
Fig. 2 UPGMA analysis of 13 loquat

## 2.2 川早枇杷与其他枇杷品种遗传关系的 ISSR 分析

用 14 条 ISSR 引物在川早枇杷和早钟 6 号中共扩增出条带 84 条,其中多态性条带 9 条,多态性比例 0.107 1;在日本茂木和川早枇杷中共扩增出条带 122 条,多态性条带 24 条,多态性比例 0.196 7,表明川早枇杷与早钟 6 号和日本茂木存在遗传差异。13 个品种(品系)的遗传相似系数为 0.618 4~0.824 4。香钟与贵妃遗传相似系数最大,为 0.824 4。黄丰与白沙遗传相似系数最小,为 0.618 4(表 3),其中日本茂木与川早枇杷的遗传相似系数最高,为 0.792 0,早钟六

号和晚钟与川早枇杷的遗传相似系数分别为 0.771 7 和 0.744 4,说明川早枇杷与其亲本早钟六号有较近的亲缘关系。大五星与川早枇杷的遗传相似系数最低,仅为 0.652 5,表明两者遗传距离较远。

## 2.3 聚类分析

根据 ISSR 分子标记结果,建立川早枇杷等 13 份枇杷材料亲缘关系树状聚类图(图 2)。在遗传相似系数为 0.758 0 时,川早枇杷与早钟六号可以被分为两类。当遗传相似系数为 0.716 0 时,13 份枇杷材料可以被分为 4 类,即 I 为解放钟;II 为白沙、

表 3 13 份枇杷材料间的遗传相似系数  
Table 3 Similarity coefficients among 13 loquat accessions

样品名称	解放钟	大五星	白沙	晚钟	大白梨	香钟	贵妃	早钟六号	朝天果	龙泉一号	川早枇杷	黄丰	日本茂木
解放钟	1.0000												
大五星	0.7174	1.0000											
白沙	0.6621	0.7027	1.0000										
晚钟	0.7226	0.7643	0.7552	1.0000									
大白梨	0.7286	0.6980	0.7365	0.7500	1.0000								
香钟	0.7252	0.6690	0.6853	0.7226	0.7926	1.0000							
贵妃	0.7445	0.6892	0.7397	0.7535	0.7958	0.8244	1.0000						
早钟六号	0.7481	0.7021	0.7183	0.7704	0.7133	0.7481	0.7926	1.0000					
朝天果	0.7246	0.7172	0.7692	0.7842	0.7517	0.7122	0.7431	0.7464	1.0000				
龙泉一号	0.6940	0.7246	0.6463	0.7050	0.6644	0.6940	0.6783	0.7424	0.6950	1.0000			
川早枇杷	0.6947	0.6525	0.7050	0.7444	0.7000	0.7344	0.7407	0.7717	0.7333	0.7287	1.0000		
黄丰	0.6739	0.6806	0.6184	0.6972	0.6918	0.7111	0.7183	0.6957	0.6759	0.6812	0.6940	1.0000	
日本茂木	0.7405	0.6713	0.6759	0.7122	0.7063	0.7273	0.7338	0.7368	0.7518	0.6963	0.7920	0.7519	1.0000

晚钟、朝天果、大白梨、香钟、贵妃、早钟六号、川早枇杷、日本茂木;Ⅲ为大五星、龙泉一号;Ⅳ为黄丰。

### 3 结论与讨论

#### 3.1 ISSR 分子标记的优点

ISSR 是由 Zietkiewicz *et al.* (1999) 创建的一种新型微卫星类分子标记技术。它来源于植物基因组中丰富的简单序列重复 (SSRs), 由 2~4 个随机的核苷酸锚定在微卫星序列的 3' 或 5' 端, 由此组成的单引物进行重复序列间 DNA 的 PCR 扩增。该分子标记技术克服了 RFLP 的技术限制以及 RAPD 重复性较低的问题, 具有操作简单、重复性高、模板 DNA 用量少等优点 (吴子龙等, 2006), 已应用于果树品种鉴定 (Goulao *et al.*, 2001)、遗传关系及遗传多样性分析等方面 (Regner *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2002)。

#### 3.2 枇杷品种间的亲缘关系

日本茂木原产我国, 是一个华裔日本枇杷品种, 于 1936 年引入四川成都和重庆 (章恢志等, 1987)。由于早钟六号是以解放钟为母本, 森尾早生为父本, 通过有性杂交获得的枇杷品种, 而森尾早生是由日本茂木芽变产生的变异品种 (陈石榕, 1984), 因此, 从聚类分析图可看出, 川早枇杷与日本茂木以及早钟六号都具有较近的亲缘关系。

枇杷品种分类一般按照生态类型、果肉颜色、果型、用途、成熟期和经济地位进行划分 (邱武陵等, 1996), 也有学者提出可按地理来源分为中国枇杷类型和日本枇杷类型 (Badenes *et al.*, 2000)。但本研究表明, 上述分类并不能体现枇杷品种 (品系) 间的

亲缘关系。比如同为白肉类型的白沙、大白梨以及贵妃三个枇杷品种间的遗传相似系数为 0.736 5~0.795 8, 且不能聚为一类; 但果肉颜色不同的‘香钟’与贵妃却首先聚为一类。‘香钟’是由解放钟和‘香甜’两个枇杷品种通过有性杂交而得的 (黄金松等, 1999), 但其与解放钟的遗传相似系数仅为 0.725 2, 进行聚类分析也相距甚远, 二者亲缘关系较远。‘晚钟’和贵妃同为晚熟枇杷品种, 但二者并未首先聚为一类。

本研究用 14 条引物对 13 份枇杷材料进行 ISSR 分析, 结果显示所有材料之间具有相同的主扩增带, 说明各枇杷品种 (品系) 间具有一定的同源性, 所扩增出的次扩增带也说明 13 份枇杷材料间存在较高的多态性 (王永清等, 2010)。川早枇杷的 DNA 较早钟六号已发生了改变, 存在遗传物质的变异, 具备成为一个优良新品种的条件。但相对于早钟六号、森尾早生及解放钟等枇杷品种, 川早枇杷在染色体形态、基因序列等遗传物质上与其存在何种差异, 还需进行相关研究。

#### 参考文献:

- 叶静渊. 1988. 中国农学遗产选集: 常绿果树 [M]. 北京: 农业出版社: 79-86  
邱武陵, 章恢志. 1996. 中国果树志·龙眼枇杷卷 [M]. 北京: 中国农业出版社: 98-117  
陈石榕. 1984. 日本的枇杷及其栽培技术 [J]. 福建果树, (1): 104-110  
章恢志. 1996. 中国果树志, 枇杷 [M]. 北京: 中国林业出版社: 31-32  
Badenes ML, Martinez JC, Llacer G. 2000. Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) [J]. *Euphytica*, **114**: 187-194  
Dong YN (董燕妮). 2008. RAPD analysis of genetic diversity of



