

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.017

沈庆庆 朱建华 彭宏祥 等. 桂西南早熟荔枝实生资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 广西植物 2013, 33(2): 225 - 228

Shen QQ, Zhu JH, Peng HX *et al.* Genetic diversity of early-maturing seedling litchi resources in southwest Guangxi by ISSR[J]. *Guihaia* 2013, 33(2): 225 - 228

桂西南早熟荔枝实生资源遗传多样性的 ISSR 分析

沈庆庆^{1 3 4}, 朱建华^{2*}, 彭宏祥², 何新华¹

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530004; 2. 广西农业科学院 园艺研究所, 南宁 530007; 3. 玉林市农业科学研究所, 广西 玉林 537000; 4. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007)

摘 要: 利用 ISSR 标记技术对 83 份早熟荔枝(品种)单株遗传多样性进行分析。筛选出多态性高的 10 条 ISSR 引物, 共扩增出 128 条 DNA 条带, 其中多态性带 107 条, 多态性百分率为 83.59%, 表明桂西南早熟荔枝实生资源遗传多样性较丰富; 用 NTSYS 软件计算出这 83 份材料的 DICE 相似系数在 0.64 ~ 0.95 之间, 遗传亲缘关系较近; 用 UPGMA 方法构建分子树状图, 在相似系数 0.75 时, 可将栽培品种与桂西南早熟实生单株区分开。各地区资源混杂聚类在一起, 不能按地区单独聚类。

关键词: 早熟荔枝; 实生资源; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: S667.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0225-04

Genetic diversity of early-maturing seedling litchi resources in southwest Guangxi by ISSR

SHEN Qing-Qing^{1 3 4}, ZHU Jian-Hua^{2*}, PENG Hong-Xiang², HE Xin-Hua¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Institute of Horticulture, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Yulin Institute of Agricultural Science, Yulin 537000, China; 4. Guangxi Key lab of Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Nanning 530007, China)

Abstract: The genetic diversities of 83 early-maturing litchi(variety) plants were examined by using ISSR markers in this study. Ten primers gave reproducible polymorphic DNA amplification patterns with a total of 128 amplified bands. The percentage of polymorphic band was 83.59%, which showed that the early-maturing seedling litchi resources in southwest Guangxi had abundant genetic diversity. The genetic similarity ranged from 0.64 to 0.95 based on DICE. A dendrogram was constructed by UPGMA method, and the early-maturing litchi(variety) plants were distinguished from cultivar litchi at a similarity coefficient criterion of 0.75. No significant correlation between the dendrogram and geographical distance was revealed among the resources.

Key words: early-maturing litchi; seedling litchi resources; genetic diversity; ISSR markers

荔枝(*Litchi chinensis*)为无患子科(Sapindaceae)荔枝属(*Litchi*)植物,是中国南亚热带地区广泛栽培的特产果树。广西荔枝种质资源丰富,桂西南地区的崇左、百色和河池市的部分乡镇有较长的早

熟实生荔枝种植历史,是广西早熟荔枝实生资源分布最集中、数量最多的区域(吴仁山等,1986)。国内有关桂西南早熟荔枝实生资源的报道较少,资料记载仅在 20 世纪 80 年代吴仁山等(1986)报道了在

* 收稿日期: 2012-08-30 修回日期: 2012-10-11

基金项目: 国家荔枝龙眼产业技术体系育种岗位“熟期育种”(CARS-33-03); 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2013YT03)

作者简介: 沈庆庆(1982-)男,山东枣庄人,硕士研究生,从事果树种质资源和生物技术研究(E-mail) weishan2005@qq.com。

通讯作者: 朱建华,研究员,从事果树种质资源和栽培技术研究(E-mail) y66899@126.com。

广西的靖西、田阳、田东、德保、天等、大新、龙州、崇左、扶绥、上思、都安、巴马、凤山、东兰等县有早熟荔枝分布,并对早熟荔枝的树体、叶片、花序、果实的性状做了初步调查;欧阳若等(2005)对广西靖西县安宁乡张氏家的一株早熟荔枝实生单株的形态学性状进行调查,并把该单株作为母本与‘三月红’杂交,培育出了特早熟杂种单株;沈庆庆等(2011)在对桂西南早熟荔枝实生资源分布调查的基础上,并对早熟荔枝实生单株的15个质量性状和32个数量性状进行统计分析。前人的研究仅从形态学水平对桂西南早熟荔枝实生资源进行研究,而利用分子标记在分子水平上对该早熟实生资源的研究尚未见报道。为此,本文旨在用ISSR分子标记法揭示桂西南早熟荔枝实生资源的遗传多样性水平,为桂西南早熟荔枝实生资源的保护和利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料取自桂西南的龙州、大新、天等、德保、靖西、田东、田阳、都安、大化等县早熟荔枝实生单株78份,广西大学果树标本园的栽培荔枝品种4份,广西灵山县荔枝品种1份(表1)。采集嫩绿或成熟叶数片,装入冰盒中带回实验室,30℃的低温冰箱中保存备用。

1.2 DNA的提取与ISSR-PCR扩增

参考刘冰浩(2008)的方法,采用改良CTAB法提取荔枝基因组DNA,通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用分光光度计测定其浓度,稀释备用。PCR反应体系是20 μL,内含10×Buffer缓冲液(含Mg²⁺ 15 mmol/L),1 U Taq DNA聚合酶,0.25 mmol/L dNTP,0.25 μmol/L引物,DNA模板85 ng/μL,dH₂O补足至体积为20 μL。反应程序94℃预变性4 min;94℃变性1 min,退火1 min,72℃延伸2 min,循环38次;72℃后延伸10 min;4℃保存。PCR扩增产物加入4 μL 6×Loading Buffer用1.8%琼脂糖胶(每100 mL加入5 μL GoldView™ DNA染料)电泳分离,D2000 DNA Ladder作为标准分子量对照,电泳电压110 v,电流48 mA,在凝胶成像系统中观察拍照。

1.3 数据统计

将所得图片采用人工计数,同一位置条带有记为1,无记为0,建立Excel表格数据库,利用NT-

表1 用于ISSR-PCR的材料及来源
Table 1 Plant materials and origin of ISSR-PCR

序号 No.	编号 Code	采集地点 Collecting location	序号 No.	编号 Code	采集地点 Collecting location
1	JX1	百色市靖西县	43	TY5	百色市田阳县
2	JX2	百色市靖西县	44	TY6	百色市田阳县
3	JX3	百色市靖西县	45	TY7	百色市田阳县
4	JX4	百色市靖西县	46	ZD1	百色市作登乡
5	JX5	百色市靖西县	47	ZD2	百色市作登乡
6	JX6	百色市靖西县	48	ZD3	百色市作登乡
7	JX7	百色市靖西县	49	DX1	崇左市大新县
8	LZ1	崇左市龙州县	50	DX2	崇左市大新县
9	LZ2	崇左市龙州县	51	DX3	崇左市大新县
10	LZ3	崇左市龙州县	52	DX4	崇左市大新县
11	LZ4	崇左市龙州县	53	DX5	崇左市大新县
12	LZ5	崇左市龙州县	54	DX6	崇左市大新县
13	LZ6	崇左市龙州县	55	DX7	崇左市大新县
14	LZ7	崇左市龙州县	56	DX8	崇左市大新县
15	LZ8	崇左市龙州县	57	DX9	崇左市大新县
16	LZ9	崇左市龙州县	58	DX10	崇左市大新县
17	DH1	河池市大化县	59	DB1	百色市德保县
18	DH2	河池市大化县	60	DB2	百色市德保县
19	DH3	河池市大化县	61	DB3	百色市德保县
20	DH4	河池市大化县	62	DB4	百色市德保县
21	DH5	河池市大化县	63	DB5	百色市德保县
22	DH6	河池市大化县	64	DB6	百色市德保县
23	DH7	河池市大化县	65	DB7	百色市德保县
24	DH8	河池市大化县	66	DB8	百色市德保县
25	DH9	河池市大化县	67	DB9	百色市德保县
26	TD1	崇左市天等县	68	DB10	百色市德保县
27	TD2	崇左市天等县	69	DB11	百色市德保县
28	TD3	崇左市天等县	70	DB12	百色市德保县
29	TD4	崇左市天等县	71	DB13	百色市德保县
30	TD5	崇左市天等县	72	DB14	百色市德保县
31	DA1	河池市都安县	73	DB15	百色市德保县
32	DA2	河池市都安县	74	DB16	百色市德保县
33	DA3	河池市都安县	75	DB17	百色市德保县
34	DA4	河池市都安县	76	DB18	百色市德保县
35	DA5	河池市都安县	77	DB19	百色市德保县
36	DA6	河池市都安县	78	DB20	百色市德保县
37	DA7	河池市都安县	79	三月红	广西大学
38	DA8	河池市都安县	80	水东	广西大学
39	TY1	百色市田阳县	81	白糖罂	广西大学
40	TY2	百色市田阳县	82	妃子笑	广西大学
41	TY3	百色市田阳县	83	四月半	广西灵山县
42	TY4	百色市田阳县			

SYS 2.10e 软件中的DICE法计算遗传相似系数,聚类分析按UPGMA(unweighted pair group method a-

rithmetic averages) 法进行。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取及质量检测结果

由琼脂糖凝胶电泳图可以看出, DNA 的条带均一, 无拖尾现象。紫外分光光度法测定其浓度, DNA 的 260/280 比值在 1.70 ~ 1.90 之间, 结果表明, 所提取的 DNA 中蛋白质、多糖和酚类等物质基本去除, 纯度较高, 符合 ISSR-PCR 的要求。

2.2 引物扩增多态性分析

利用优化的反应体系从 100 条 ISSR 引物中筛选出了 10 条条带清晰、重复性好的引物进行统计分析, 结果显示 10 条引物共扩增出 128 条条带, 其中有 107 条多态性条带, 占总条带 83.59%, 说明供试的各样品间遗传多样性比较丰富。每条引物可扩增出 9 ~ 15 条带, 平均扩增 12.8 条带, 扩增产物介于 320 ~ 2 000 bp 之间, 其中以 350 ~ 1 600 bp 的扩增片段居多(表 2)。

表 2 ISSR 引物和多态性分析

Table 2 ISSR primers and polymorphic analysis

引物 Primer	总条带数 No. of total bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性比例 Percentage of polymorphic bands (%)
UBC811	9	8	88.89
UBC818	15	13	86.67
UBC824	12	11	91.67
UBC835	13	10	76.92
UBC840	11	8	72.73
UBC841	15	12	80.00
UBC844	14	11	78.57
UBC848	13	12	92.31
UBC852	12	10	83.33
UBC857	14	12	85.71
总数 Total	128	107	—
平均 Average			83.59%

2.3 聚类分析

通过 NTSYS 2.10e 软件对 83 份早熟荔枝(品种)单株的 ISSR 扩增结果进行计算, 结果表明, 供试的早熟荔枝(品种)单株的遗传相似性系数变化范围在 0.64 ~ 0.95 之间, 表明这些单株的亲缘关系比较近。按 UPGMA 方法构建亲缘关系树状图, 在 0.70 的相似水平下可分为 3 个类群, 第一类群为栽培品种和部分采自德保的早熟荔枝实生单株; 第二类群为采自田阳、田东、龙州和部分采自都安、大新、

德保的早熟荔枝实生单株; 第三类群为采自天等和大化的早熟荔枝实生单株, 以及部分采自靖西、大新、都安和德保的早熟荔枝实生单株(图 1)。可见, 各地区资源混杂聚类在一起, 不能按地区单独聚类。

聚类分析发现, 在相似系数为 0.75 时, 可将栽培品种与桂西南早熟实生单株区分开。可见, 桂西南早熟荔枝实生单株与栽培品种是不同的荔枝类型。

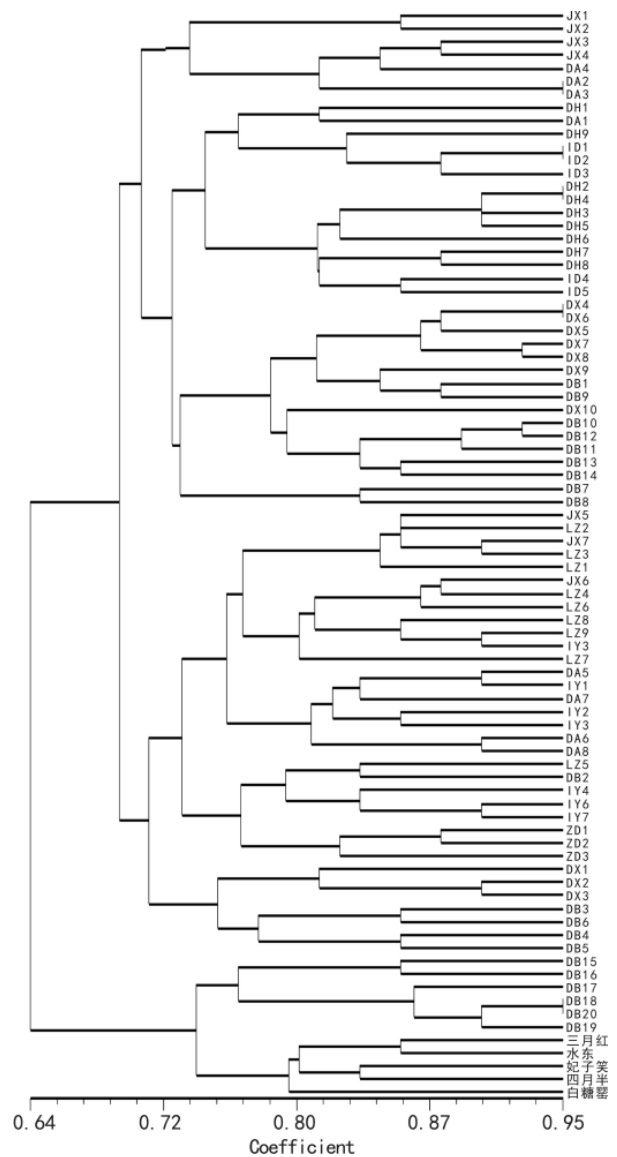


图 1 83 个早熟荔枝(品种)单株的 ISSR 聚类分析图谱
Fig. 1 Dendrogram of phylogenetic relationship among 83 early litchi(variety) plants by ISSR markers based on UPGMA analysis

3 结论与讨论

ISSR 分子标记是一种基于微卫星序列发展起

来的新的分子标记,具有简便迅速、稳定高效、DNA多态性高,同时克服了 RFLP 技术的局限性和 RAPD 的假阳性等优点(张青林等,2004)。本研究利用 ISSR 标记对桂西南早熟荔枝实生资源进行遗传多样性的研究,10 条 ISSR 引物多态性条带比率为 83.59%,与采用 ISSR 分子标记对李(81.3%)、南丰蜜橘(82.35%)、山楂(86.4%)、芒果(87.25%)等所得平均多态性条带比率相近(王进等,2008;吕荣军等,2009;代红艳等,2008;余贤美等,2007),高于杨荣萍等(2007)利用 RAPD 分子标记石榴的多态性条带比率 72.07%。研究表明,ISSR 标记技术能较好地揭示材料间的遗传变异,可用于分析该早熟实生资源的遗传多样性和亲缘关系,为资源的保存、测定和良种培育提供依据。

从分子水平来说,遗传距离的变幅越大,表明其遗传分化越大,遗传多样性越高,遗传背景越复杂,且该物种存在历史越长远(Martins *et al.*, 2003)。桂西南早熟实生荔枝资源遗传相似性系数变化范围在 0.64~0.95 之间,遗传多样性比较丰富,其中这也与沈庆庆等(2011)通过对桂西南早熟荔枝实生资源的植物学性状分析得到的结果一致。同时也说明,物种的遗传多样性水平体现在不同的层次上,要通过多种方法,从不同层次上研究分析,才能比较准确地评价物种的遗传多样性水平。

研究还发现,早熟栽培品种在遗传上有较大差异,但与部分德保县的早熟荔枝实生单株亲缘关系较近。另外,在其它 3 个类群中,早熟荔枝实生单株并非以县域为界限进行聚类,原因是部分早熟荔枝实生资源分布在县与县交界的地带,也说明不同县域之间的早熟荔枝相互传播繁殖,已有相邻县域之间的近距离传播(如田东县和田阳县),也有较远距离的传播(如大化县和天等县)。

参考文献:

- 刘冰浩. 2008. 广西部分野生、半野生、栽培荔枝遗传多样性 SSR 分析及博白野生荔枝种群生存研究[D]. 南宁: 广西大学
- 吴仁山, 张国辉, 胡友群, 等. 1986. 广西荔枝志[M]. 广州: 广东科技出版社: 100-103
- Dai HY(代红艳), Guo XW(郭修武), Zhang Y(张叶) *et al.* 2008. Genetic diversity of *Crataegus pinnatifida* Bge. as evaluated by RAPD and ISSR markers(山楂遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 标记分析)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报) **35**(8): 1117-1124
- Lü RJ(吕荣军), Yin S(殷珊), Zhu YL(朱友林). 2009. Nanfeng orange(*Citrus reticulata* Blanco var. *kinokuni*(Tanaka) H. H. Hu) and its closely related varieties based on ISSR markers(南丰蜜橘及近缘品种的 ISSR 标记)[J]. *Chin Fruits*(中国果树), (1): 15-19
- Ou YR(欧阳若), Hu GB(胡桂兵), Wang ZH(王泽槐). 2005. Excavation and utilization of early mature germplasm litchi resources in China(我国早熟荔枝种质资源的发掘及研究利用)[J]. *Chin Trop Agric*(中国热带农业) **1**(5): 30-32
- Martins M, Tenreiro R, Oliveira M. 2003. Genetic relatedness of portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers[J]. *Plant Cell Rep* **22**: 71-78
- Shen QQ(沈庆庆), Zhu JH(朱建华), Peng HX(彭宏祥) *et al.* 2011. Study on investigation of early mature seedling litchi resources in southwest Guangxi(桂西南早熟荔枝实生资源调查)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报) **27**(22): 291-295
- Yang RP(杨荣萍), Long WH(龙雯虹), Yang ZA(杨正安) *et al.* 2007. Phylogenetic relationship among *Punica granatum* L. germplasm resources based on RAPD markers(石榴品种资源的 RAPD 亲缘关系分析)[J]. *J Henan Agric Sci*(河南农业科学) **24**(5): 69-72
- Yu XM(余贤美), Ai CX(艾呈祥). 2007. Genetic diversity of wild *Mangifera indica* populations detected by ISSR(芒果野生居群遗传多样性 ISSR 分析)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报) **22**(3): 19-23
- Zhang QL(张青林), Luo ZR(罗正荣). 2004. ISSR technology and its applications in fruit trees (ISSR 及其在果树上的应用)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报) **21**(1): 54-58
- Wang J(王进), He Q(何桥), Ou Y(欧毅) *et al.* 2008. Germplasm identification and phylogenetic analysis of plum using ISSR marker(李种质资源 ISSR 鉴定及亲缘关系分析)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报) **25**(2): 182-187