

甘薯种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

罗文彬,蔡南通,邱永祥,吴秋云,许泳清

(福建农业科学院 作物研究所,福建 福州 350013)

【摘要】 【目的】明确保存的甘薯种质资源的遗传背景,为甘薯杂交育种提供理论依据。【方法】应用 ISSR 分子标记技术,对 34 份甘薯种质资源进行了遗传多样性分析。【结果】15 个 ISSR 引物在 34 份甘薯种质材料中共扩增出 2 187 条带,其中多态性带有 1 099 条,平均每个引物扩增出 73. 27 条多态性带,多态性百分率为 50. 25%;聚类分析将 34 份甘薯种质材料划分为 4 大类。【结论】明确了具有代表性的甘薯种质材料的遗传背景,为今后甘薯杂交育种提供了初步理论依据。

【关键词】 甘薯;种质资源;遗传多样性; ISSR

【中图分类号】 S531. 024 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)10-0110-05

Genetic diversity of sweet potato by ISSR markers

LUO Wen-bin, CAI Nan-tong, QIU Yong-xiang, WU Qiu-yun, XU Yong-qing

(Crop Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 The study determined the genetic diversity of sweet potato to give the theoretical basis for the breeding of sweet potato. 【Method】 The ISSR marker technology was used to analyze the genetic diversity of 34 sweet potato varieties. 【Result】 2 187 total bands were amplified from 34 sweet potato varieties with 15 ISSR primers, among which were 1 099 polymorphic bands. The polymorphic percentage was 50. 25%. The 34 sweet potato varieties were clustered into four groups. 【Conclusion】 The genetic diversity of these varieties was determined by the analysis, which gives the theoretical basis for the breeding of sweet potato.

Key words: sweet potato; germplasm; genetic diversity; ISSR

ISSR(Inter-simple sequence repeat)又称简单重复序列间扩增,是由 Zietkiewicz 等^[1]发展起来的一种新型分子标记技术。其以 PCR 技术为基础,利用真核生物基因组中广泛存在的简单重复序列(SSR)来设计引物,无需预先克隆和测序。ISSR 标记结合了 RAPD 和 SSR 的优点,具有模板需要量少、多态性丰富、无需试剂盒、结果记录方便、实验成本低、操作简单、实验稳定性较高等优点^[2-4]。

目前,ISSR 已在水稻、玉米、烤烟、辣椒等多种作物的遗传多样性、亲缘关系鉴定等方面得到应

用^[5-8]。在甘薯遗传育种中,利用 ISSR 标记分析种质资源遗传多样性的研究很少。Huang 等^[9]用 ISSR 标记和位于基因组 DNA 中 4 个未编码的限制性位点变异,检测了 40 个甘薯品种的遗传多样性和遗传关系;对基因组 DNA 的限制性分析,揭示了 47 个有价值的限制性位点和长度变异;对 ISSR 和基因组 DNA 的系统发育学分析,揭示出种间水平的相似关系,但高的 ISSR 多态性将导致更明显的种间分离;然而,将 ISSR 和基因组 DNA 相联系更适合于解决种间和种内关系;在检测的所有品种中,野

* [收稿日期] 2007-11-06
[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2006J0323)
[作者简介] 罗文彬(1976—),男,福建永安市,助理研究员,硕士,主要从事薯类作物育种研究。E-mail: wbluo@yahoo. cn

生种 *Ipomoea trifida* 与栽培甘薯亲缘关系最近,而野生种 *I. ramosissima* 和 *I. umbraticola* 与栽培甘薯亲缘关系最远;迄今为止被认为是甘薯祖先之一的近缘野生种 *I. triloba*,是惟一的一个基于 ISSR 标记与甘薯有远缘关系的。贺学勤等^[10] 利用 RAPD、ISSR 和 AFLP 分子标记,将来自安徽、福建、河南和广东的 48 个甘薯地方品种聚为两大类,一类以 8 个广东地方品种为主,另一类由剩余的 8 个广东地方品种和其余 3 省的 32 个地方品种组成。但是以上研究并未对国内外的甘薯改良品种和地方品种进行遗传多样性分析。福建省农科院作物所目前保存的甘薯种质资源有 600 多份,对这些品种的遗传多样性还不明确,为了弄清这些品种的遗传多

样性,以便应用于甘薯遗传改良,本研究用 ISSR 分子标记技术,对保存的部分有代表性的甘薯种质资源进行了遗传多样性分析,以期为甘薯的种质资源鉴定和育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 试材为来自中国、日本、美国 and 秘鲁的 34 份甘薯品种,其中包括地方品种、改良品种和引进品种(表 1)。在甘薯大田封垄期,每品种取 10 株植株的顶部未展开叶,每株取 2 片,共取 20 片,自然晾干后,混匀,置于 4 ℃ 保存待用。

表 1 34 份甘薯品种的名称及其来源

Table 1 Names, collection numbers and origins of 34 sweet potato

序号 No.	品种名称 Varity name	来源 Region	序号 No.	品种名称 Varity name	来源 Region
1	蓬尾 Pengwei	广东 Guangdong	18	狗血种 Gouxuezhong	广东 Guangdong
2	韭菜种 Jiucaizhong	广东 Guangdong	19	红心早 Hongxinzhao	四川 Sichua
3	乌骨企龙 Wuguqilong	广东 Guangdong	20	日清 1 号 Riqing 1	日本 Japan
4	鸟食种 Niaoshizhong	福建 Fujian	21	红东 Hongdong	日本 Japan
5	鸡母薯 Jimuzhong	福建 Fujian	22	南瑞茗 Nanruishao	美国 America
6	永春五齿 Yongchunwuchi	福建 Fujian	23	黄金千贯 Huangjinqianguan	日本 Japan
7	鸡蛋黄 Jidanhuang	湖南 Hunan	24	深圳引 Shenzhenyin	日本 Japan
8	青骨企龙 Qingguqilong	广西 Guangxi	25	升平 Shengping	日本 Japan
9	鸟种 Niaozhong	广东 Guangdong	26	护国 Huguo	日本 Japan
10	台湾碰 Taiwanpeng	台湾 Taiwan	27	红小町 Hongxiaoding	日本 Japan
11	红皮薯 Hongpishu	广东 Guangdong	28	胜南 Shengnan	日本 Japan
12	四季红 Sijihong	广东 Guangdong	29	百壹万 Baiyiwan	日本 Japan
13	菜纤薯 Caixianshu	福建 Fujian	30	秘鲁 1 号 Bilu 1	秘鲁 Peru
14	五爪薯 Wuzhuashu	广东 Guangdong	31	遗字 138 Yizi 138	北京 Beijing
15	杭州土种 Hangzhoutuzhong	浙江 Zhejiang	32	新种花 Xinzhonghua	福建 Fujian
16	海沙 Haisha	广西 Guangxi	33	金山 57 Jinshan 57	福建 Fujian
17	不论春 Bulunchun	广东 Guangdong	34	湘薯 75-55 Xiangshu 75-55	湖南 Hunan

1.1.2 主要试剂与仪器 PCR 反应的 *Taq* 酶、10×Buffer(Mg²⁺) 为自配;dNTP 为上海生工生物工程技术有限公司产品;PCR 反应在 PTC-100 多功能 PCR 仪中进行。

1.2 甘薯基因组 DNA 的制备

甘薯基因组 DNA 的提取参照 Huang 等^[9] 的方法。

1.3 ISSR 引物的筛选

引物序列参照 Huang 等^[9] 所使用的引物,不同引物退火温度不同。ISSR 由华大基因-上海鼎安生物科技有限公司合成。

1.4 甘薯 ISSR 反应体系的建立与优化

PCR 反应在 PTC-100 多功能 PCR 仪中进行,ISSR 反应体系的总体积为 20 μL,各种反应物的终浓度为:1×Buffer[10 mmol/L Tris-HCl, pH 值

8.0,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,0.08% NP40],10 ng 模板 DNA,1.5 U *Tag* 酶,50 ng 引物,2.5 mmol/L dNTP 2 μL。各种反应物加完后,最后加 30 μL 石蜡油覆盖,以防止反应过程中液体蒸发。

ISSR 反应程序参照 Huang 等^[9] 和贺学勤等^[10] 的方法,并加以优化,最终的反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,50~55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min 30 s,45 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。

1.5 电泳检测

PCR 产物经含 EB 的 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用 BIO-RAD 公司的 Gel Doc1000 型凝胶成像仪观察并照相。

1.6 数据分析

应用 DPS 统计软件,按扩增带的有无记数,当

某一扩增带出现时,赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。参照 Nei 等^[11]的方法求得品种 i 和 j 之间的遗传距离(Genetic distance,GD):

$$GD=-\ln[2N_{ij}/(N_i+N_j)]。$$

式中, N_i 表示品种 i 的条带数目, N_j 表示品种 j 的条带数目, N_{ij} 表示品种 i 和 j 共有的条带数目,然后用平均聚类法(UPGMA)对其进行聚类分析。

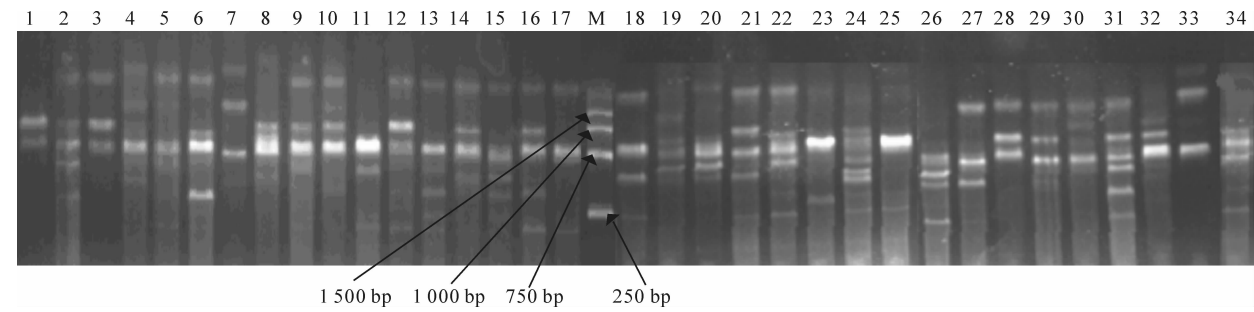


图 1 引物 825 对 34 份甘薯种质材料的 PCR 扩增结果
M, Marker DL2000;1~34. 与表 1 中 34 个甘薯品种序号对应

Fig. 1 The PCR amplified products of primer 825 of the 34 sweet potato varieties

M, Marker DL2000;1-34. Correspond to the 34 sweet potato varieties in teh table 1

2.2 甘薯遗传多样性的 ISSR 分析

2.2.1 产物的多态性 PCR 扩增结果表明,15 个 ISSR 引物对 34 份甘薯种质材料的基因组 DNA 共

2 结果与分析

2.1 甘薯 ISSR 反应体系的检测

用所建立的 ISSR 反应体系,对 34 份甘薯种质材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增及琼脂糖电泳检测,结果获得了清晰的电泳图(图 1),并且实验的重复性好。

扩增出 2 187 个条带,其中有 1 099 条多态性带,平均每个引物扩增出 73. 27 条多态性带,多态性百分率为 50. 25%(表 2)。

表 2 不同 ISSR 引物对 34 份甘薯种质材料基因组 DNA 的扩增结果

Table 2 The amplification results of the 34 sweet potato varieties with ISSR primer

引物 Primer	序列 Sequence	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	引物 Primer	序列 Sequence	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands
807	(AG) ₈ T	143	75	857	(AC) ₈ YG	145	77
811	(GA) ₈ A	95	61	861	HVH(TG) ₇	153	85
817	(CA) ₈ A	199	97	864	(ATG) ₆	156	88
819	(GT) ₈ A	129	61	878	(GGAT) ₄	148	80
825	(AC) ₈ T	115	47	888	BDB(CA) ₇	157	89
835	(AG) ₈ YC	79	11	890	VHV(GT) ₇	174	72
841	(GA) ₈ YC	159	91	891	(ACC) ₆	178	42
850	(GT) ₈ YC	157	123	合计	Total	2 187	1 099

2.2.2 遗传多样性分析 由图 2 可以看出,当遗传距离按 0. 34 划分时,可以将 34 个甘薯品种分为 4 个类群:蓬尾、胜南等 30 个品种组成类群 I,南瑞茗和红小町组成类群 II,护国、乌骨企龙各为一个类,分属类群 III 和 IV。

当遗传距离按 0. 29 划分时,又可以将类群 I 的 30 个品种划分为 6 个亚类群:韭菜种、升平、遗字 138 等 10 个品种聚为亚类群 I₁;乌食种、鸡蛋黄、四季红、日清 1 号、深圳引、新种花、红心早、秘鲁 1 号、鸡母薯、青骨企龙、五爪薯、台湾碰、海沙、菜纤

薯、杭州土种和狗血种 16 个品种聚为亚类群 I₂;蓬尾、胜南、鸟种和红皮薯各自为一个亚类(分别定为 I₃、I₄、I₅ 和 I₆)。

在亚类群 I₁ 中,韭菜种、升平、遗字 138、永春五齿、不论春和百壹万等 6 个品种聚为一类,它们的遗传相似系数在 0. 20~0. 26,虽然这些品种中有地方品种、改良品种和外来品种,其地理来源不同,但基因型差异较小,亲缘关系较近。红东、黄金千贯、湘薯 75-55 和金山 57 聚为一类,这 4 个都是国内外的改良品种,它们聚在一起可能是因为这些品种有

相同或相近的亲本。

亚类群 I₂ 中,鸟食种、鸡蛋黄、四季红、日清 1 号、深圳引、新种花、红心早和秘鲁 1 号聚为一类。新种花是福建自然选育的品种,秘鲁 1 号、日清 1 号和深圳引是外引品种,其他 4 个品种是地方品种,它们两两之间的遗传相似系数都小于 0.30,基因型差异较小,亲缘关系较近。鸡母薯、青骨企龙、五爪薯、台湾碰、海沙、菜纤薯、杭州土种和狗血种等 8 个品种聚为一类,这些品种除了台湾碰外,其余都是地方品种,两两之间的遗传相似系数在 0.13~0.29,基因型差异小,遗传基础相对比较窄,特别是青骨企龙和五爪薯的相异系数只有 0.13,亲缘关系很近。在育种工作实践中,这些亲缘关系很近的品种最好不要用作亲本组配。

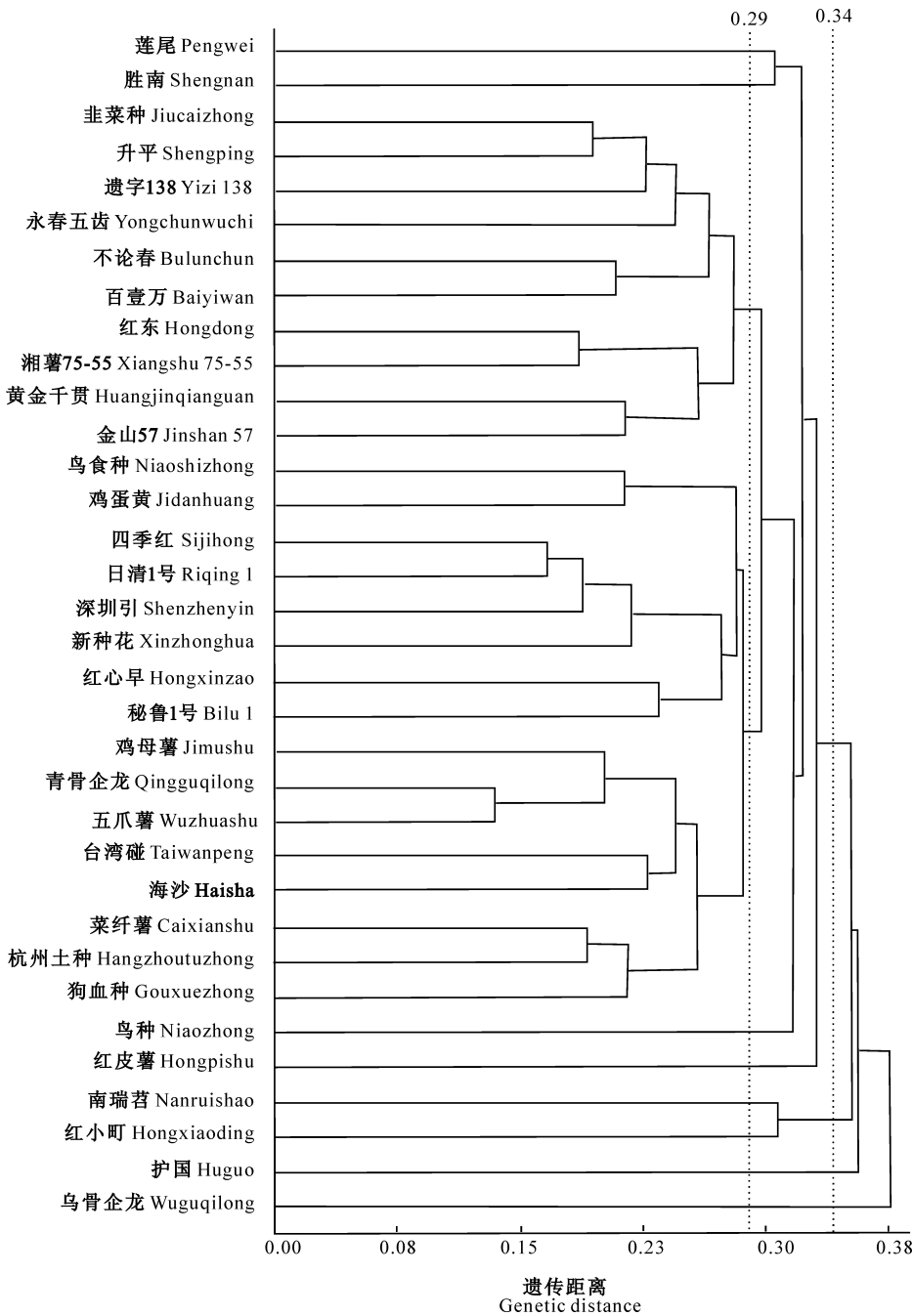


图 2 基于 ISSR 数据的 34 个甘薯品种的聚类图

Fig. 2 The dendrogram of 34 sweet potato varieties based on the result of ISSR data

3 讨 论

遗传多样性可以揭示不同品种之间的亲缘关系远近,可为杂交育种中亲本的选配提供极有价值的信息。由于受取材、时间、环境和人为等因素的影响,传统的形态特征很难鉴定品种及其来源,特别是在品种非常相似时,更容易将不同品种混杂。本试验证明,由于 ISSR 标记所用的引物长度一般为 15~24 bp,退火温度为 50~55 ℃,保证了引物扩增的重复性和特异性,提高了分类结果的准确性。通过聚类分析,明确了 34 份具有代表性的甘薯种质材料的遗传背景,为今后甘薯的杂交育种提供了初步理论依据。本试验未将国内外的 34 份甘薯品种按其来源完全区分,究其原因可能是供试材料在长期保存过程中受到当地气候环境的影响,也可能是甘薯基因组中存在有大量微卫星序列造成的^[12-13]。此外,甘薯为同源六倍体作物,染色体组基数为 15,在使用 ISSR 分子标记分析时应该筛选出数量尽量多(至少 15 个)的标记进行分析,这样可提高精确度。

[参考文献]

[1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics,1994,20:176-183.

[2] 岳建萍. DNA 分子标记技术在植物种质资源鉴定中的应用 [J]. 生物学通报,2003,38(12):15-16.
Yue J P. The use of DNA marker technology in the identification of plant germplasm [J]. Bulletin of Biology, 2003, 38 (12):15-16. (in Chinese)

[3] 庄 丽,彭子模,穆培源,等. 试论 DNA 分子标记在植物学科上的研究进展与应用前景 [J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2003,22(2):56-59.
Zhuang L, Peng Z M, Mu P Y, et al. Development and application of DNA molecular markers in plants [J]. Journal of Xinjiang Normal University: Natural Sciences Edition, 2003, 22 (2):56-59. (in Chinese)

[4] 朱 颜,周国利,吴玉厚,等. 遗传标记的研究进展和应用 [J]. 延边大学农学报,2004,26(1):64-69.
Zhu Y, Zhou G L, Wu Y H, et al. Progress and application of genetic markers [J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2004, 26(1):64-69. (in Chinese)

[5] 万亚涛,阿新祥,樊传章,等. 云南疣粒野生稻 34 个居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国水稻科学,2006,20(6):596-602.
Wan Y T, A X X, Fan C Z, et al. ISSR analysis on genetic di-

versity of the 34 populations of *Oryza meyeriana* distributed in Yunnan province [J]. Chinese J Rice Sci, 2006, 20(6): 596-602. (in Chinese)

[6] 程春明,石云素,宋燕春,等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 植物遗传资源学报,2005, 6 (2): 172-177.
Cheng C M, Shi Y S, Song Y C, et al. Suitability of ISSR markers in analysis of genetic relationships among maize inbred lines [J]. Journal of Plant Genetic Resource, 2005, 6 (2): 172-177. (in Chinese)

[7] 杨本超,肖炳光,陈学军,等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究 [J]. 遗传,2005,27(5):753-758.
Yang B C, Xiao B G, Chen X J, et al. Genetic diversity of Flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers [J]. Hereditas, 2005, 27(5):753-758. (in Chinese)

[8] 杨若林,孔 俊,吴 鑫. ISSR 标记在辣椒资源遗传多态性分析中的初步应用 [J]. 上海大学学报:自然科学版,2005,11 (4):235-237.
Yang R L, Kong J, Wu X. Application of ISSR markers in genetic polymorphism of *Capsicum frutescens* L [J]. Journal of Shanghai University: Natural Science Edition, 2005, 11 (4): 235-237. (in Chinese)

[9] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:1050-1060.

[10] 贺学勤,刘庆昌,王玉萍,等. 中国甘薯地方品种的遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学,2005,38(2):250-257.
He X Q, Liu Q C, Wang Y P, et al. Analysis of genetic diversity of sweetpotato landraces in China [J]. Chinese Agricultural Science, 2005, 38(2):250-257. (in Chinese)

[11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of National Academy of Sciences. USA, 1979, 76:5269-5273.

[12] 杨友才,周清明,尹晗琪. 利用 RAPD 和 AFLP 标记分析烟草种质资源的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报,2006,14 (4):585-593.
Yang Y C, Zhou Q M, Yi H Q. Analysis of genetic diversity in tobacco germplasm by RAPDs and AFLPs [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4):585-593. (in Chinese)

[13] Ukoskit K, Thompson P G, Watson C E J. Identifying a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker linked to a gene for rootknot nematode in sweetpotato [J]. Journal of American Society for Horticultural Sciences, 1997, 122 (6): 818-821.