

利用 ISSR 技术对优质红锥种质资源遗传多样性的分析

王 蕾¹, 叶志云¹, 蒋 2, 王鸣刚¹, 陈 亮^{*}

(1 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

2 广西林业科学研究院, 广西 南宁 530001)

摘要: 利用 ISSR 分子标记对 10 个优质红锥品种进行基因组多态性分析. 从 20 条引物中筛选的 11 条具有扩增多态性的引物共扩增出 435 条带, 其中多态性条带 325 条, 占总扩增条带的 74.7%, 平均每个引物扩增 3.95 条. ISSR 标记揭示的 10 个优质红锥品种的遗传相似系数变化范围为 0.473 7~ 0.808 1, 平均值为 0.728 7. 聚类分析可将 10 个优质红锥品种分为四类.

关键词: 红锥; ISSR 标记; 遗传多样性

中图分类号: Q 753

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-009-F-04

红锥 (*Castanopsis hystrix* A. DC.) 别名红栲、红柯, 属壳斗科常绿乔木^[1], 分布于我国广东、广西、云南以及贵州、湖南、江西、福建、海南等省, 包括西藏的墨脱县^[2], 中心分布区在广西南部. 红锥具有生长快、材质优、适应广、效益高等优良特性, 其主干通直、材质坚硬、纹理细致、耐腐性强, 可供建筑、造船、高级家具、体育器材等用; 种子富含淀粉, 可作饲料、酿酒; 种实、壳斗含单宁, 可制取栲胶; 枝叶浓密, 混生性能好, 萌发力强, 是与松、杉混交造林的最好伴生树种之一^[3]. 近 20 多年来, 红锥的优良特性逐步为科研和生产部门所重视. 开展优树选择和良种选育, 提高遗传增益, 加快红锥生产的良种化进程, 提高红锥林的单位面积产量, 已成为华南地区发展珍贵用材树种的当务之急^[4].

采用 ISSR 标记对广西省 10 个优质红锥品种进行遗传多样性分析, 旨在从分子水平上探讨其遗传关系, 为红锥资源合理保护及开发利用和优质红锥选育以及解释其系统发育提供理论依据, 也为红锥 DNA 指纹图谱的构建奠定基础.

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料选用广西林科所试验基地的 10 个优质红锥品种的新鲜叶片, 采样后样品立即放入超低温冰

箱备用. 材料来源详见表 1. 试剂 Taq DNA 聚合酶购于晶美生物有限公司, 单核苷酸 (dNTP)、CTAB 等试剂均购于上海生工有限公司.

1.2 实验方法

(1) 红锥总 DNA 提取: 每个红锥品种随机选取 15 个个体的混合叶片, 采用改进的 CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide 十六烷基三甲基溴化铵) 法提取总 DNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, DNA 的纯度和浓度通过紫外吸收法测定.

(2) ISSR-PCR 扩增: ISSR 反应条件经过筛选和优化确定为 20 μ L 反应体系中, 模板 60 ng, 1U Taq 酶, 1.5 mmol/L Mg²⁺, dNTP 0.25 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, 2% 甲酰胺. PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52~55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 产物在 2.0% 琼脂糖上电泳, 凝胶成像系统拍照.

(3) 引物筛选: ISSR 引物由上海生工公司合成. 根据 PCR 结果, 从 20 个引物 (表 2) 中选出 11 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应. 变性温度根据引物的 T_m 值变化 1~3 $^{\circ}$ C.

(4) 数据处理与统计分析: 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) 记作 0. 强带和弱带的赋值均为 1. 对于多态位点, 仅在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析.

数据的统计分析方法: 利用 STATIS 统计软件的欧氏可变类平均法构建类型之间的分子系统树, 并计算两个类型之间的遗传距离.

收稿日期: 2005-12-23

基金项目: 广西林业科学研究院国家林业局中南速生材繁育重点实验室开放基金课题 (2005-1), 国家林业局年度重点项目“红锥优良种区域化实验示范”课题 (99-31), 广西“千百千人才工程”专项基金

作者简介: 王蕾 (1982-), 女, 硕士研究生.

* 通讯作者: chenl@xmu.edu.cn

表 1 10个优质红锥品种来源

Tab 1 10 varieties of *Castanopsis hystrix* from different areas of Guangxi

品种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
品种名称	广东 1号	浦北	广东 2号	苍梧	容县	东兰	凭祥	博白	广东 3号	宁明

2 结果与分析

2.1 优质红锥模板 DNA 提取结果

CTAB法提取 10个优质红锥品种的总 DNA 见图 1. 紫外分光光度计定量后, 各取 50 ng用于 PCR 扩增.

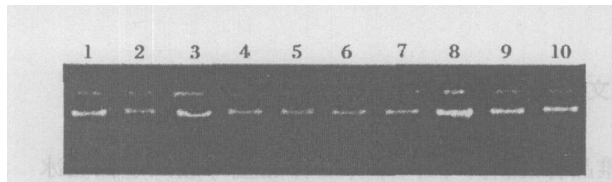


图 1 红锥总 DNA 电泳结果

Fig 1 Total DNA of *Castanopsis hystrix*

2.2 优质红锥的 ISSR 扩增结果

从 20条引物中筛选出 11条具有扩增多态性的引物用于 ISSR-PCR 扩增. 11条 ISSR引物共扩增出 325条重复性高, 清晰的多态性条带(图 2, 3), 分子量在 120~ 2 000 bp之间, 多态性条带比率为 74.7%, 平均每个引物扩增 39.5条.

2.3 聚类分析

根据 DNA 扩增结果计算遗传距离, Nei's 遗传距离(GD)的范围在 0.1919~ 0.5068. 遗传距离和遗传相似性系数见表 3. 其中, 容县(5)和凭祥(7)的遗传距离最近(GD = 0.1919), 广东 1号(1)和浦北(2)的遗传距离最远(GD = 0.5068). 基于 Nei's 遗传距离, 根据 LPCMA 法构建了 10个优质红锥品种的聚类图见图 4. 10个优质红锥品种可以分为 4个品种群, 其中容县和凭祥遗传关系最近与东兰、广东 1号、广东 3号、宁明聚为第一类群, 苍梧和博白为第二类群, 广东 2号为第三类群, 浦北与其他 9种遗传关系最远聚为第四类群.

3 讨论

3.1 ISSR 用于红锥遗传多样性分析的可行性

ISSR 技术的原理和操作与 SSR, RAPD 相似, 只是引物设计要求不同, 其长度一般都在 15~ 24 bp. 反应的退火温度为 52~ 55°C, 比 RAPD 的 36~ 40°C 高, 因此对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD. ISSR 引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列在

DNA 复制的过程中存在滑动和不等交换现象, 使得它们在不同品种或个体间的重复次数存在较大差异, 更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片段长度产生差异^[5, 6], 其产物多态性远远比 RFLP, SSR, RAPD 丰富, 可以提供更多的关于基因组的信息, 而且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 实验重复性更好. 在 ISSR 反应体系中加入 2% 甲酰胺能够降低由于引物滑动而引起的背景模糊, 加入 2% ~ 4% DMSO 能提高反应的特异性^[7]. 可以说 ISSR 结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 既具有 RAPD 的操作简单、检测结果方便的特点, 又具有 SSR 的稳定性优势, 并且 ISSR 花费小, 容易操作. 所以 ISSR 标记是一种快速、可靠、可以提供有关基因组丰富信息的 DNA 指纹技术, 有着很好的发展前景^[8].

3.2 红锥遗传多样性分析

基因型是遗传和生态两个因素长时期复杂的相互作用的产物, 土壤和地理环境对种内变异起重要作用^[9, 10], 广西壮族自治区各地地理差别极大, 它地处东经 104°29' ~ 112°04', 北纬 20°54' ~ 26°20'; 南濒北部湾, 北为南岭山地, 西连云贵高原, 全区的地形总趋势是西北向东南倾斜, 有台地、盆地、丘陵、溶岩等地形交错分布. 主要气候受太阳强烈幅射和冬夏季风环流的影响. 广西在区域上属云贵高原向东南沿海丘陵过渡地带, 形成了复杂多样的地貌类型, 气候特点为广西北半部属中亚热带气候, 南半部属南亚热带气候, 广西年降雨量差异显著在 1 000~ 2 800 mm 之间. 太阳年总辐射量达 376~ 418 kJ/cm²·a. 差异显著的地理形势造成红锥形成稳定的遗传多样性.

通过 ISSR 分子标记对 10个优质红锥品种基因组的分析发现, 它们的遗传相似系数变化范围为 0.4737 ~ 0.8081, 均小于种内群居间的遗传一致度 0.90^[9, 10]. 多态位点百分率是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标, 是度量遗传多样性的重要参数, Hamrick 和 Godt^[11] 用等位酶对 449个种进行植物遗传变异研究, 揭示种的多态位点平均水平为 50.5%, 种群多态位点平均水平为 34.2%. 本研究表明 ISSR 分析的多态性条带百分比为 74.7%, 高于种和种群的平均水平, 说明 10个优质红锥品种经过长期在不同的地理环境下进化已经形成了较大的遗传差异.

表 2 ISSR 引物序号与序列

Tab 2 List of ISSR primers and their sequences

引物序号	引物序列 (5'-3')	引物序号	引物序列 (5'-3')
1	GAGAGAGAGAGAGAA	11	TCTCTCTCTCTCTCA
2	GAGAGAGAGAGAGAC	12	TCTCTCTCTCTCTCG
3	AGAGAGAGAGAGAGT	13	TGTGTGTGTGTGTGA
4	AGAGAGAGAGAGAGST	14	ACACACACA CA CACACG
5	AGAGAGAGAGAGAGSA	15	GAGAGAGAGAGAGAT
6	CTCTCTCTCTCTCTA	16	ACACACACA CA CACACCG
7	CTCTCTCTCTCTCTG	17	TCTCTCTCTCTCTCAT
8	CTCTCTCTCTCTCTT	18	CACCA CACACACA
9	CTCTCTCTCTCTCTW G	19	TCTCTCTCTCTCTCC
10	CTCTCTCTCTCTCTW C		

表 3 Nei氏遗传相似性系数 (上方)和遗传距离 (下方)

Tab 3 Nei's genetic identity (above) and genetic distance (below)

PopID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		0.4932	0.4737	0.7467	0.7297	0.7089	0.7333	0.6742	0.7294	0.6905
2	0.5068		0.6933	0.6389	0.6119	0.6205	0.6640	0.6818	0.6583	0.6988
3	0.5263	0.3067		0.6849	0.6588	0.6329	0.6444	0.6292	0.6118	0.6429
4	0.2533	0.3611	0.3151		0.7073	0.6842	0.6897	0.6744	0.6829	0.6667
5	0.2706	0.3881	0.3412	0.2927		0.7729	0.8081	0.6468	0.7660	0.6882
6	0.2911	0.3795	0.3671	0.3158	0.2273		0.7527	0.7392	0.7273	0.735
7	0.2667	0.3360	0.3556	0.3103	0.1919	0.2473		0.7184	0.7879	0.7347
8	0.3258	0.3182	0.3708	0.3256	0.3532	0.2608	0.2816		0.7551	0.7216
9	0.2706	0.3417	0.3882	0.3171	0.2340	0.2727	0.2121	0.2449		0.7826
10	0.3095	0.3012	0.3571	0.3333	0.3118	0.2644	0.2653	0.2784	0.2174	

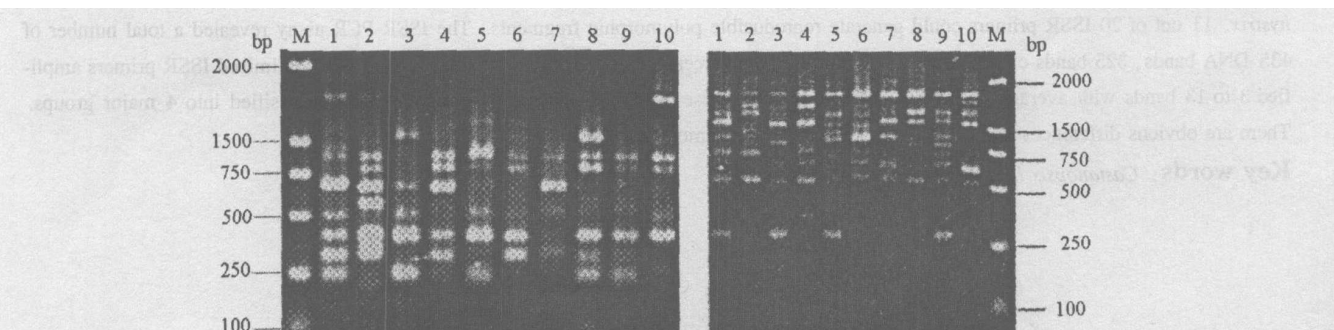


图 2 ISSR 引物 9 的 PCR 扩增结果

Fig 2 PCR result of primer 9

图 3 ISSR 引物 14 的 PCR 扩增结果

Fig 3 PCR result of primer 14

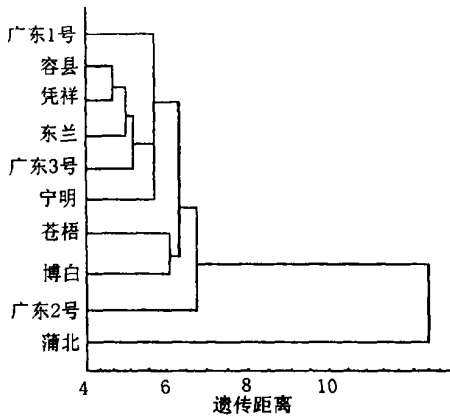


图 4 10个优质红锥品种的 ISSR 聚类分析树状图

Fig 4 Dendrograms for 10 *Castanopsis hystrix* varieties based on ISSR markers

朱积余等在广西红锥地理种源试验初报中的发现^[3]:各优质红锥在种子千粒重、苗木高生长、地径生长方面存在明显的遗传差异,各试验点比较表明树高、地径以蒲北和博白最好,而容县的种源最差.我们的遗传距离分析结果也表明蒲北和博白与其他红锥品种遗传距离最远,容县与其余品种的遗传距离较近,但可能由于其适应性差、生长速度较慢,使得种源较差.

参考文献:

[1] 黄全能,陈存及,邱尔发,等.红锥天然林群落特征研究[J].亚热带植物通讯,1998,27(2):7-11.

[2] 黄永权,梁东成,张方秋,等.广东省红锥遗传改良进展及改良策略初探[J].广东林业科技,2004,20(4):58-60

[3] 朱积余,蒋,丘小军,等.广西红锥地理种源试验初报[J].广西林业科学,1997,26(2):66-68

[4] 朱积余,蒋,潘文,等.广西红锥优树选择标准研究[J].广西林业科学,2002,31(3):109-113

[5] 钱韦,葛颂,洪德元.采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J].植物学报,2000,42(7):741-750

[6] Gilbert J E, Lewis R B, Wilkinson V I J et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1125-1131

[7] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1311-1320

[8] 胡绍庆,邱英雄,吴光洪,等.桂花品种的 ISSR-PCR 分析[J].南京林业大学学报:自然科学版,2004,28(S):71-75

[9] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1996,38(12):954-962

[10] 徐炳声.生态变异在植物分类学和进化中的重要性[J].广西植物,1986,6(3):201-216

[11] Hamrick J L, Godt M J W. A Bayesian diversity in plant species[M]// Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland Mass Sinauer, 1989: 43-46

Genetic Diversity of *Castanopsis hystrix* by ISSR Analysis

WANG Lei¹, YE Zhiyun¹, JIANG Yi², WANG Ming-gang¹, CHEN Liang^{1*}

(1 Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering School of Life Sciences Xiamen Univ., Xiamen 361005, China; 2 Guangxi Academy of Forestry, Nanning 530001, China)

Abstract In this study, inter simple sequence repeat (ISSR) was evaluated for its potential use in the identification of 10 *Castanopsis hystrix*. 11 out of 20 ISSR primers could generate reproducible polymorphic fragments. The ISSR-PCR assay revealed a total number of 435 DNA bands, 325 bands of which were polymorphic (the percentage of polymorphic bands is 74.7%). Optimized ISSR primers amplified 3 to 13 bands with average of 3.95 bands per primer. These 10 *Castanopsis hystrix* surveyed were classified into 4 major groups. There are obvious differences and abundant genetic diversities among the *Castanopsis hystrix* species.

Key words *Castanopsis hystrix*; ISSR; genetic diversity