

江浙地区杨梅主要品种的 ISSR 分析

钱剑林^{1,2}, 俞文生³, 王化坤^{2,3}, 娄晓鸣², 章 镇^{2,①}

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏 苏州 215008; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095;

3. 江苏省太湖常绿果树技术推广中心, 江苏 苏州 215107)

摘要: 为研究江浙地区杨梅 (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) 的亲缘关系, 运用 ISSR-PCR 分析方法对其主要栽培品种进行了分析。8 条引物扩增出 58 个 DNA 片段, 其中多态性片段 42 个, 占总扩增片段的 72.4%。结合遗传距离分析, 运用 UPGMA 法构建了分子系统树。结果表明, 所分析的 14 个品种和 1 个优良单株以 0.14 为结合线可分为 5 组, 说明江浙地区的杨梅在广泛基因交流的情况下, 存在局部的隔离。‘小叶细蒂’与‘极早熟 1 号’亲缘关系较近, 前者可能是后者的亲本之一。

关键词: 杨梅; ISSR; 品种鉴定; 亲缘关系

中图分类号: S667.602.3; Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)03-0017-04

Analysis on ISSR marker of primary cultivars of waxberry in Jiangsu and Zhejiang QIAN Jian-lin^{1,2}, YU Wen-sheng³, WANG Hua-kun^{2,3}, LOU Xiao-ming², ZHANG Zhen^{2,①} (1. Suzhou Polytechnical Institute of Agriculture, Suzhou 215008, China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Extension Center for Evergreen Fruit of Taihu, Suzhou 215107, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(3): 17-20

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) was used to analysis genomic DNA variations and genetic relationships of waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) in Jiangsu and Zhejiang provinces. 8 of 11 ISSR primers were proved to be polymorphic and informative. Total 58 DNA fragments were amplified and 42 were polymorphic (72.5%). The genetic distance was analysed according ISSR result and a dendrogram was constructed using UPGMA method. All cultivars tested were classified into 5 groups and the excellent individual (Jizaoshu No. 1) has a close relationship with ‘Xiaoyexidi’. This indicates that there were a wide gene flow and topical isolation between waxberry cultivars of two provinces. Maybe ‘Xiaoyexidi’ was a parent of ‘Jizaoshu No. 1’.

Key words: waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.); ISSR; cultivar identification; genetic relationship

杨梅 (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) 特产于中国, 主要分布于长江流域以南、海南省以北的山地, 与普通水果品种相比, 杨梅的经济附加值较高, 已进入迅猛发展的时期。

对杨梅种质资源的研究报道较多^[1-4], 但由于传统研究方法的缺陷, 无法辨别突变与饰变, 也无法鉴定同种异名及对新品种进行最终的鉴定, 导致分类意见不一, 且存在矛盾^[5]。20 世纪 90 年代以后出现的 DNA 分子标记技术, 具有多态性高、重复性及可靠性好的优点, 且不受采样部位、季节和环境等外部因素限制, 是较为理想的分类和亲缘关系研究及品种鉴定的手段^[6]。目前果树上最常用的分子标记方法有 RFLP、RAPD、SCAR、SSR、ISSR 和 AFLP 等, 而仅有 RAPD^[7-9] 和 ISSR^[10] 应用于杨梅的分子

标记研究。由于 ISSR 技术^[11] 操作简单、稳定性和重复性好, 且片段多态性更高, 现已广泛应用于遗传作图、基因定位、遗传多样性及系统发育等方面的研究中。

江苏和浙江 2 省都是中国杨梅种质资源最丰富的省份之一, 其中浙江省有杨梅品种 140 多个, 江苏有 30 余个, 并且均有大量的野生种质资源。对杨梅种质资源的分子标记研究有利于杨梅种质资源的保护、利用及新品种的培育。因此, 作者运用 ISSR 分子标记技术对江浙地区的主要杨梅品种进行了分

收稿日期: 2006-03-10

作者简介: 钱剑林(1962-), 男, 江苏无锡人, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为园艺育种。

① 通讯作者

析,并对筛选出来的优良单株‘极早熟1号’进行了亲缘关系分析。

1 材料和方法

1.1 材料与预处理

14个杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)品种和1个优良单株叶片样品均于2005年10月采自江苏省太湖常绿果树技术推广中心杨梅资源圃(江苏省苏州市东山镇),其中‘大叶细蒂’(Dayexidi)‘小叶细蒂’(Xiaoyexidi)‘乌梅’(Wumei)‘极早熟1号’(Jizaoshu No. 1)‘大纪’(Daji)‘桃红’(Taohong)和‘甜山’(Tianshan)来源于江苏省;‘东魁’(Dongkui)‘荸荠种’(Biqizhong)‘丁岙’(Ding’ao)‘早色’(Zaose)‘早荠’(Zaoji)‘晚荠’(Wanji)‘小纪’(Xiaoji)和‘早大’(Zaoda)来源于浙江省。每个品种采集20片幼嫩的秋稍叶片(相对较嫩的老叶)装入自封袋(8 cm × 12 cm)中,加入硅胶,使叶片与硅胶混匀,以便快速干燥。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 运用CTAB法^[12],并做以下改进:1)将样品进行预磨样;2)加入预热的CTAB提取液,涡旋3 s;3)16℃离心。DNA质量用1%琼脂糖电泳检测,DNA浓度用Eppendorf biophotometer核酸蛋白检测仪测定,取3次测定的平均值。

1.2.2 ISSR反应条件 针对PCR过程中密切相关的因素设计正交实验以确立最佳的反应体系。最佳体系如下:rTaq(5 U · μL⁻¹) 0.4 μL,10倍缓冲液(MgCl₂ free) 2.5 μL,MgCl₂(25 mmol · L⁻¹) 1 μL,dNTP混合物(各2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL,引物(10 μmol · L⁻¹) 3 μL,模板DNA(10 ng · μL⁻¹) 2 μL,含2%去离子甲酰胺,ddH₂O补足至总体积25 μL。

PCR扩增在PTC-100™ PCR仪上进行。反应程序为94℃预变性5 min,94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 2 min,45个循环,最后于72℃延伸5 min。取PCR产物10 μL加入6倍上样缓冲液2 μL,用1%琼脂糖电泳,并采用FR-200紫外与可见分析装置拍照分析。

1.2.3 引物筛选 按文献[10]筛选出11条ISSR引物序列(见表1),由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2.4 扩增产物和谱带的分析方法 条带的记录:电泳图谱的每条带(DNA片段)均记为1个分子标记,代表1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)记为0,强带和弱带的赋值均为1。对于多态位点,仅将在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析。

表1 用于杨梅ISSR分析的引物和序列¹⁾

Table 1 Primers and sequences for ISSR analysis of waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)¹⁾

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
YMISSR-1	(GACA) ₄	YMISSR-7	GSG(GT) ₆
YMISSR-2	BDB(CA) ₆	YMISSR-8	GGA(CTG) ₄
YMISSR-3	VHV(GT) ₇	YMISSR-9	CCA(GTG) ₄
YMISSR-4	DBD(GA) ₇	YMISSR-10	(AG) ₈ T
YMISSR-5	(CT) ₈ RC	YMISSR-11	(GA) ₈ T
YMISSR-6	CCC(GT) ₆		

¹⁾B = not A; D = not C; H = not G; R = A or G; S = C or G; V = not T.

数据统计分析方法:数据转换成mega格式,利用MEGA 3.1软件进行统计,用UPGMA法构建分子系统树。

2 结果和分析

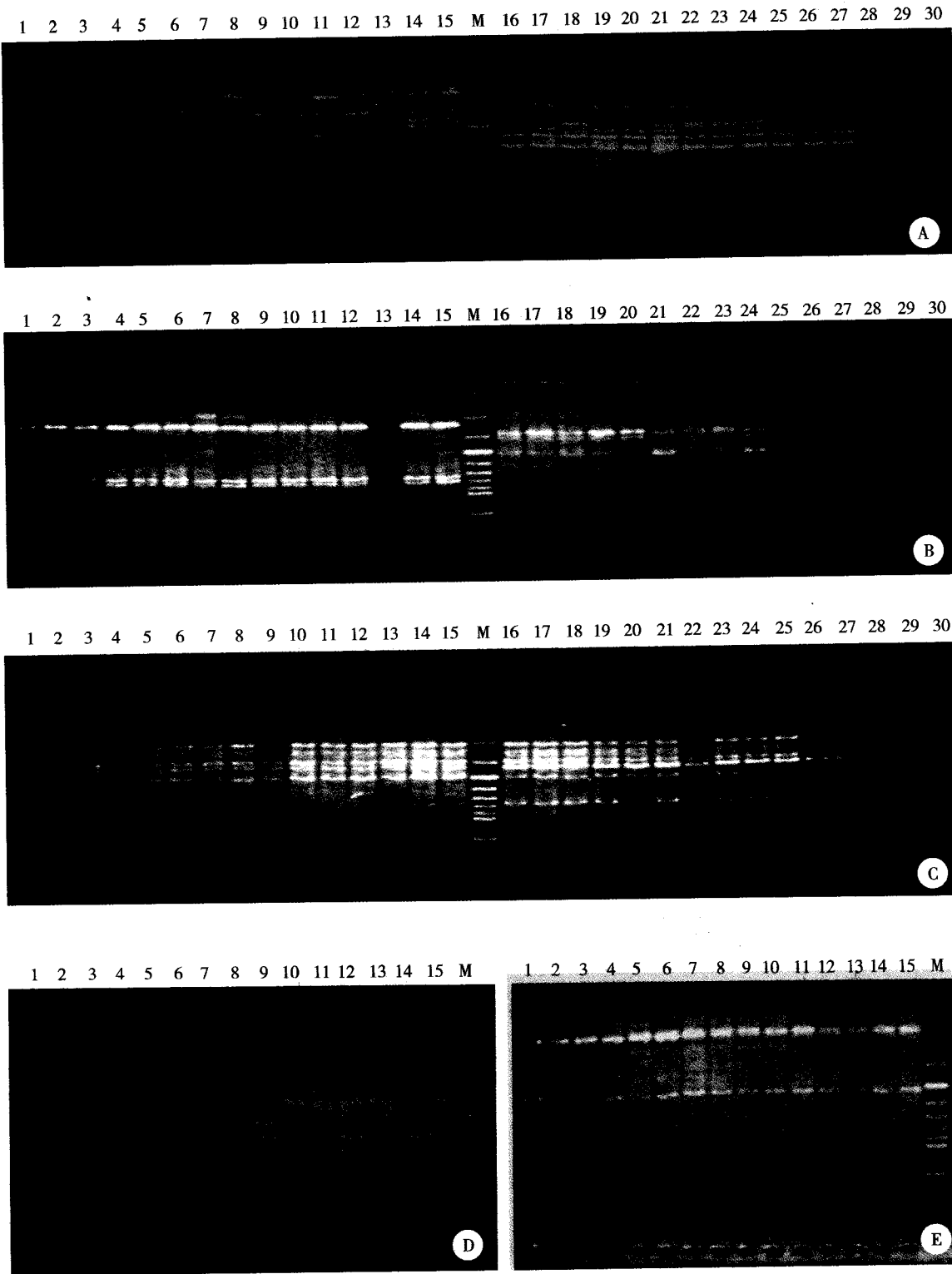
2.1 杨梅品种基因组多样性分析

所选用的11个引物中有8条产生了清晰有效、重复性好的条带(图1),引物YMISSR-4、YMISSR-7、YMISSR-11扩增产物模糊,故弃去。8条有效引物共扩增出58条谱带(表2),其中多态性DNA条带42条,占总带数的72.4%,每个引物扩增的DNA条带数目在4~10条之间,平均7.25条,扩增出的DNA条带的大小在100~1 000 bp之间。

在有效的8条引物中,引物YMISSR-1、YMISSR-2、YMISSR-3和YMISSR-6扩增出的片段较多,多态性条带比例较高,其中YMISSR-1、YMISSR-2和YMISSR-3扩增出的多态性条带有20条,可以区分所有供试样品。

2.2 杨梅品种间遗传距离与聚类分析

14个主要杨梅品种及优良单株‘极早熟1号’的遗传关系树状图见图2。从图2可看出,以遗传距离0.14为结合线,15个样品可划分为5组。第1组包括‘大叶细蒂’、‘丁岙’、‘荸荠种’、‘甜



A: YMISSR - 1 和 YMISSR - 2 的扩增结果 Amplification fragments by YMISSR-1 and YMISSR-2; B: YMISSR - 5 和 YMISSR - 6 的扩增结果 Amplification fragments by YMISSR-5 and YMISSR-6; C: YMISSR - 8 和 YMISSR - 9 的扩增结果 Amplification fragments by YMISSR-8 and YMISSR-9; D: YMISSR - 3 的扩增结果 Amplification fragments by YMISSR-3; E: YMISSR - 10 的扩增结果 Amplification fragments by YMISSR-10. 1,16: 大叶细蒂 Dayexidi; 2,17: 小叶细蒂 Xiaoyexidi; 3,18: 乌梅 Wumei; 4,19: 极早熟 1 号 Jizaoshu No. 1; 5,20: 大纪 Daji; 6,21: 桃红 Taohong; 7,22: 甜山 Tianshan; 8,23: 东魁 Dongkui; 9,24: 荸荠种 Biqizhong; 10,25: 丁香 Ding'ao; 11,26: 早色 Zaose; 12,27: 早茅 Zaoji; 13,28: 晚茅 Wanji; 14,29: 小纪 Xiaoji; 15,30: 早大 Zaoda; M: 100 bp Marker.

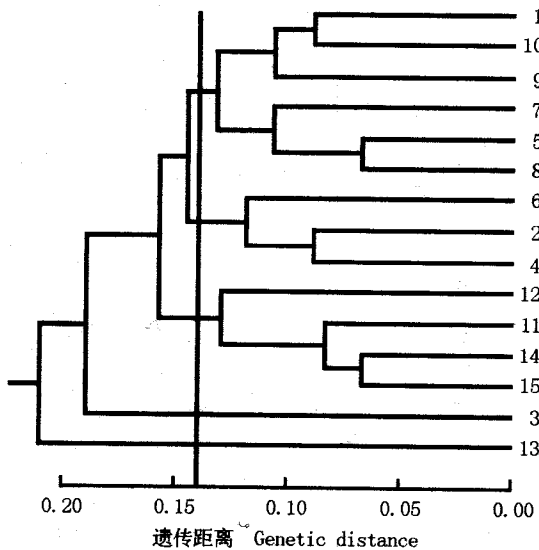
图1 江浙地区主要杨梅品种的 ISSR 分子标记图谱

Fig. 1 Band patterns of ISSR molecular markers of cultivars of waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) in Jiangsu and Zhejiang provinces

山’、‘大纪’和‘东魁’等6个江浙杨梅品种;第2组包括‘桃红’、‘小叶细蒂’和‘极早熟1号’等3个江苏品种;第3组为‘早芥’、‘早色’、‘小纪’和‘早大’等4个品种,除‘小纪’外其他3个均为浙江品种;第4组为‘乌梅’;第5组为‘晚芥’。

表2 江浙地区杨梅主要品种 ISSR 分析中各引物的扩增情况
Table 2 Amplifications of 8 effective primers in ISSR analysis of cultivars of waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) in Jiangsu and Zhejiang provinces

引物 Primer	扩增条带数 Total number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带率/% Percentage of polymorphic band
YMISSR-1	8	6	75.0
YMISSR-2	10	7	70.0
YMISSR-3	7	7	100.0
YMISSR-5	5	5	100.0
YMISSR-6	8	8	100.0
YMISSR-8	8	3	37.5
YMISSR-9	8	4	50.0
YMISSR-10	4	2	50.0
总计 Sum	58	42	
平均 Mean	7.25	5.25	72.4



1: 大叶细蒂 Dayexidi; 2: 小叶细蒂 Xiaoyexidi; 3: 乌梅 Wumei; 4: 极早熟1号 Jizaoshu No. 1; 5: 大纪 Daji; 6: 桃红 Taohong; 7: 甜山 Tianshan; 8: 东魁 Dongkui; 9: 荸荠种 Biqizhong; 10: 丁香 Ding'ao; 11: 早色 Zaose; 12: 早芥 Zaoji; 13: 晚芥 Wanji; 14: 小纪 Xiaoji; 15: 早大 Zaoda.

图2 江浙地区主要杨梅品种的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of genetic distance between waxberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) cultivars in Jiangsu and Zhejiang provinces

3 讨 论

江浙2省杨梅栽培历史悠久,品种资源丰富,群体内的变异较多。由于地缘相近,存在着普遍的种质资源交流,ISSR分析的结果也说明了这一点。根据UPGMA聚类分析的结果可看出,第1组的6个品种包含有3个浙江品种和3个江苏品种,第3组中也包含3个浙江品种和1个江苏品种,江苏与浙江的杨梅品种没有明显的地理差异;而第2组均为江苏品种,说明江苏和浙江2省杨梅种质资源在基因普遍交流的情况下也存在局部的隔离。

‘极早熟1号’是从江苏东山实生杨梅中选育出来的优良单株,具有早熟、质优的特点。聚类分析结果表明,其与‘小叶细蒂’的亲缘关系较近,后者可能是‘极早熟1号’的亲本之一。

参考文献:

- [1] 俞德浚. 中国果树分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979. 305-309.
- [2] 刘宁, 乙引. 矮杨梅叶的鉴定研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2003, 25(2): 56-58.
- [3] 张喜焕, 刘宁. 4种类型矮杨梅花粉形态扫描电镜观察[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2005, 23(2): 6-9.
- [4] Handa T, Kajiura I. Isozyme analysis of yamamomo (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) cultivars [J]. Japanese Journal of Breeding, 1991, 41(2): 203-209.
- [5] 陈方永, 陈国文, 方文敏. 浙江省杨梅经济栽培品种发展对策研究[J]. 江西园艺, 2005(3): 2-4.
- [6] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [7] Williams J G K, Kubeik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [8] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [9] 林伯年, 徐林娟, 贾春蕾. RAPD技术在杨梅属植物分类研究中的应用[J]. 园艺学报, 1999, 26(4): 221-226.
- [10] 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 杨梅不同品种的ISSR分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 343-346.
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [12] Cheng F S, Brown S K, Weeden N E. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species [J]. Hortscience, 1997, 32(5): 921-922.