

基于 ISSR 标记的黄河下游区域 鲁桑地方品种遗传关系分析

张林^{1,2,3}, 黄勇^{3,4}, 沈兴家^{2,4}, 刘利², 赵卫国², 强胜^{1,①}

(1. 南京农业大学生命科学学院杂草研究室, 江苏 南京 210095; 2. 中国农业科学院蚕业研究所, 江苏 镇江 212018;
3. 江苏科技大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018; 4. 国家农业部蚕桑遗传改良重点开放实验室, 江苏 镇江 212018)

摘要: 应用 ISSR 分子标记技术对来自黄河下游区域(山东省和河北省)的 46 个鲁桑 [*Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud.] 地方品种的遗传多样性进行了分析; 并基于遗传相似系数、采用 UPGMA 法对这些地方品种的遗传关系进行了研究。结果表明, 用 15 个 ISSR 引物从 46 个鲁桑地方品种的总 DNA 中共扩增出 109 条带, 其中多态性条带 81 条, 多态性条带百分率为 74.31%, 表明供试的鲁桑地方品种间存在丰富的遗传多样性; 46 个地方品种间的遗传相似系数为 0.602~0.898, 相对偏高。聚类分析结果显示, 46 个鲁桑地方品种被分为 2 类, 其中, 第 1 类包含来自河北的品种‘冀丰’和‘冀黄鲁选’, 第 2 类包含其余 44 个品种; 后者还能进一步分成 9 个亚类, 其中 A、E、F、G、H 和 I 亚类所包含的 36 个品种均来自山东, 组成 B、C 和 D 亚类的品种分别来自河北和山东; 此外, E 亚类仅包含‘白条擗桑’1 个品种, 是 46 个品种中唯一的三倍体品种。研究结果显示, 基于 ISSR 标记分析的 46 个鲁桑地方品种的遗传关系与地理分布具有一定的相关性。

关键词: 鲁桑; 地方品种; ISSR; 聚类分析; 遗传关系

中图分类号: Q946-33; S663 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)02-0021-07

Analysis of genetic relationship of local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* from the lower area of Yellow River based on ISSR marker ZHANG Lin^{1,2,3}, HUANG Yong^{3,4}, SHEN Xing-jia^{2,4}, LIU Li², ZHAO Wei-guo², QIANG Sheng^{1,①} (1. Weed Research Laboratory, Life Sciences College of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China; 3. Biological and Environmental Engineering College, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 4. The Key Laboratory of Genetic Improvement of Silkworm and Mulberry, Ministry of Agriculture, Zhenjiang 212018, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(2): 21-27

Abstract: Genetic diversity of forty-six local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud. from the lower area of Yellow River (Shandong Province and Hebei Province) was analyzed by ISSR molecular marker technique. And according to the genetic similarity coefficient, the genetic relationship among these local varieties was researched by UPGMA method. The results show that 109 bands are amplified from total DNA of forty-six local varieties using fifteen ISSR primers, in which, there are 81 polymorphic bands with a percentage of polymorphic band of 74.31%. It means that there is rich genetic diversity among different tested local varieties. The genetic similarity coefficients among forty-six local varieties are relatively high with a range of 0.602-0.898. The cluster analysis results show that forty-six local varieties are divided into two categories, in which, ‘Jifeng’ and ‘Jihuanguluxuan’ from Hebei Province are clustered to the first category, the other forty-four varieties are clustered to the second one. And the latter can be further divided into nine subcategories, in which, the thirty-six varieties belonging to A, E, F, G, H and I subcategories all originate from Shandong Province, the varieties belonging to B, C and D subcategories originate from Hebei Province and Shandong Province, respectively. Besides,

收稿日期: 2009-09-09

基金项目: 国家科技基础条件平台子项目(2005DKA21002-09)

作者简介: 张林(1964—), 男, 江苏镇江人, 博士研究生, 副研究员, 主要从事植物种质资源与遗传育种方面的研究。

①通信作者 E-mail: wrl@njau.edu.cn

subcategory E contains one variety ‘Baitiaopisang’ which is only one triploid variety in forty-six local varieties. It is suggested that the genetic relationship of forty-six local varieties of *M. alba* var. *multicaulis* based on ISSR marker has a certain correlation with geographical distribution.

Key words: *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud.; local variety; ISSR; cluster analysis; genetic relationship

在中国,桑(*Morus alba* L.)的栽培历史悠久,遗传资源十分丰富。根据地理分布可将中国桑地方品种分为 8 个不同的生态类型,每个生态类型均有各自的特征,在枝条形态、叶形大小、发芽期、抗逆性等方面都有一定的差异。黄河下游区域栽培的鲁桑 [*Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud.] 是 8 个生态类型之一,是中国北方主蚕区的代表性桑品种,也是中国桑品种资源库的重要组成部分^[1-2],主要分布在山东省蚕区,也包括河北省的部分蚕区。

ISSR 分子标记具有简单和重复性好的优点,已广泛应用于桑树的分子生物学研究。其原理是根据植物中广泛存在简单重复序列(SSR)的特点,利用在植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,用于扩增的引物通常具有 16~18 个碱基,一般由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,无需预先克隆和测序。目前已广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究中。

目前,有关桑树 ISSR 分子标记的研究较多,研究方向主要集中于桑树遗传多样性和亲缘关系方面,研究对象主要是不同品种以及不同生态类型。Vijayan 等^[3-5]采用 ISSR 分子标记对印度的桑属(*Morus* L.)栽培品种、高产品种及野生种进行了遗传多样性分析;Awasthi 等^[6]采用 ISSR 分子标记对桑树的部分栽培品种进行了亲缘关系分析,研究结果显示品种间差异明显;赵卫国等^[7-14]利用 ISSR 分子标记对桑树的栽培种和野生种、二倍体、同源四倍体、选育品种、芽变类型以及 8 个不同生态类型进行了遗传多样性分析及分子系统学研究;Kar 等^[15]利用与某些生化性状有关的 ISSR 标记分析了印度桑树遗传资源的遗传变异和亲缘关系。但迄今为止,对桑树同一生态类型不同地方品种间亲缘关系的研究却较少,对鲁桑地方品种遗传多样性的研究则未见报道。

作者利用 ISSR 分子标记技术对黄河下游区域(河北省和山东省)46 个鲁桑地方品种的遗传多样性

进行了分析,以期在分子水平上研究鲁桑不同地方品种的遗传关系,为鲁桑种质资源 DNA 指纹图谱的建立及品种鉴定提供科学依据。这对于鲁桑种质资源的保护、重要农艺性状基因的发掘和利用都具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 46 个鲁桑地方品种均种植于江苏镇江的国家桑树资源圃,原产地及各地地方品种的主要性状见表 1。采集当年生嫩叶供试。

实验使用的 ISSR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, *Taq* DNA 聚合酶、PCR buffer、*d*NTPs 以及 DL2000 marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

随机采集各地方品种当年生新鲜嫩叶,用 CTAB 法^[16]提取总 DNA,并置于 -70 °C 条件下保存、备用。用鲁桑品种‘大鸡冠’的总 DNA 对 23 个 ISSR 引物进行初步筛选,选择扩增条带清晰、多态性高、重复性好且扩增结果稳定的 15 个引物,用于 46 个鲁桑地方品种总 DNA 的 ISSR 扩增反应。

ISSR-PCR 反应体系总体积为 15 μ L,包括 10 ng 模板 DNA、0.7 μ L 引物(10 ng \cdot μ L⁻¹)、1 U *Taq* DNA 聚合酶、1.5 μ L 10 \times PCR buffer 和 0.25 μ L *d*NTPs (200 μ mol \cdot L⁻¹),用纯水补足至 15 μ L。

ISSR-PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 2 min;然后于 94 °C 变性 40 s、40 °C ~ 60 °C 退火 45 s(根据每个引物的 *T_m* 值设定具体退火温度)、72 °C 延伸 90 s,共 36 个循环反应;最后于 72 °C 延伸 7 min。扩增产物置于 4 °C 条件下保存。

ISSR-PCR 扩增产物通过用质量体积分数 1% 的琼脂糖凝胶(含质量浓度 0.5 μ g \cdot mL⁻¹EB)进行电泳检测,并对电泳结果进行拍照记录。

表1 供试46个鲁桑地方品种的原产地及主要性状

Table 1 The origins and main characters of forty-six local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud. for tested

编号 No.	地方品种名 Name of local variety	原产地 Origin	性别 Sex	桑椹色泽 Mulberry colour	染色体倍性 Chromosome ploidy
1	大鸡冠 Dajiguan	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
2	小黄桑 Xiaohuangsang	山东新泰 Xintai of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
3	青黄桑 Qinghuangsang	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
4	昌维黑鲁 Changweiheilu	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain
5	莱芜接桑 Laiwujiesang	山东莱芜 Laiwu of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
6	梧桐桑 Wutongsang	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
7	银红椹鸡冠 Yin hongshenjiguan	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	-	不详 Uncertain
8	白条瓣桑 Baitiaopisang	山东蒙阴 Mengyin of Shandong	雄株 Male	-	三倍体 Triploid
9	益都大白条 Yidudabaitiao	山东青州 Qingzhou of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Uncertain
10	昌维大白条 Changweidabaitiao	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
11	新泰打桑 Xintaidasang	山东新泰 Xintai of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
12	羊角弯 Yangjiaowan	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
13	黑鲁接桑 Heilujiesang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	-	不详 Uncertain
14	铁干桑 Tiegansang	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
15	梓楞桑 Beiluosang	河北宽城 Kuancheng of Hebei	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
16	深县黄鲁 Shenxianhuanglu	河北深县 Shenxian of Hebei	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
17	大碗桑 Dawansang	河北深县 Shenxian of Hebei	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
18	碗桑 Wansang	河北深县 Shenxian of Hebei	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
19	红条瓣桑 Hongtiaopisang	山东蒙阴 Mengyin of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
20	营子桑 Yingzisang	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
21	鸡冠一生子 Jiguan yishengzi	山东临朐 Linqu of Shandong	-	-	不详 Uncertain
22	大叶一生子 Dayeyishengzi	山东临朐 Linqu of Shandong	-	-	不详 Uncertain
23	龙头桑 Longtousang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain
24	黑鲁桑 Heilusang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	不详 Uncertain
25	邹平黄鲁 Zoupinghuanglu	山东邹平 Zouping of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
26	沂水黄鲁头 Yishuihuanglutou	山东沂水 Yishui of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
27	杨善黑鲁 Yangshanheilu	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain
28	铁叶黄鲁桑 Tiejuehuanglusang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
29	打鲁桑 Dalusang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	不详 Uncertain
30	黑鲁头 Heilutou	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain
31	滕州 872 Tengzhou 872	山东滕州 Tengzhou of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	二倍体 Diploid
32	口头黑鲁 Koutouheilu	山东淄博 Zibo of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
33	九山黑鲁 Jiushanheilu	山东临朐 Linqu of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
34	周村黄鲁 Zhoucunhuanglu	山东新泰 Xintai of Shandong	雄株 Male	-	二倍体 Diploid
35	驴耳桑 Lü'ersang	山东淄川 Zichuan of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	不详 Uncertain
36	选 792 Xuan 792	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	二倍体 Diploid
37	黄鸡冠 Huangjiguan	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	不详 Uncertain
38	黄芯采桑 Huangxincaisang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
39	黄鲁头 Huanglutou	山东临朐 Linqu of Shandong	雌株 Female	黑色 Black	二倍体 Diploid
40	沂源黄鲁头 Yiyuanhuanglutou	山东沂源 Yiyuan of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
41	大鸡桑芽变 Dajisangyabian	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	不详 Uncertain
42	小鸡冠 Xiaojiguan	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
43	三岔黄鲁 Sanchahuanglu	山东沂源 Yiyuan of Shandong	雄株 Male	-	不详 Uncertain
44	李召桑 Lizhaosang	山东临朐 Linqu of Shandong	雌雄同株 Monoecious	黑色 Black	二倍体 Diploid
45	冀丰 Jifeng	河北承德 Chengde of Hebei	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain
46	冀黄鲁选 Jihuangluxuan	河北邢台 Xingtai of Hebei	雌株 Female	黑色 Black	不详 Uncertain

1.3 数据分析

按照清晰易辨、重复、稳定的原则对扩增条带进

行统计,有条带的记为“1”、同一位置没有条带的则记为“0”,以此形成 0、1 数据矩阵。统计每个引物扩增

出的条带数和其中的多态性条带数,并计算多态性条带百分率。按照 Nei 等^[17]的方法,利用 Popgene 3.0 (PHYLIP 3.5 版本)系统分析软件计算各地方品种间的遗传相似系数和遗传距离,并采用类平均数聚类方法(UPGMA)进行聚类分析,构建鲁桑地方品种间的遗传关系树状图。

2 结果和分析

2.1 ISSR 扩增结果

经过初筛实验,从 23 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性高、重复性好且扩增结果稳定的 15 个引物用于 46 个鲁桑地方品种指纹图谱的构建和遗传多样性分析,引物序列和扩增结果见表 2,引物

ISSR04 的扩增图谱见图 1。

由表 2 可见,在筛选出的 15 个引物中,12 个引物 (ISSR03 ~ ISSR07 和 ISSR09 ~ ISSR15) 含有 2 个碱基的微卫星重复单位,2 个引物 (ISSR02 和 ISSR08) 含有 3 个碱基的微卫星重复单位,1 个引物 (ISSR01) 含有 4 个碱基的微卫星重复单位。通过 PCR 反应,共扩增出 109 条清晰条带,其中多态性条带 81 条,多态性条带百分率为 74.31%,平均每个引物扩增的条带数为 7.3 条,平均每个引物扩增的多态性条带数为 5.4 条。不同引物扩增的条带数为 5 ~ 11 条,引物 ISSR11 扩增出的条带数最少,仅有 5 条;引物 ISSR05 扩增出的条带数最多,为 11 条。各引物扩增出的片段大小为 250 ~ 2 000 bp (图 1)。

表 2 用于 46 个鲁桑地方品种总 DNA ISSR 标记分析的引物序列及扩增结果

Table 2 Primer sequence and amplification results of ISSR marker analysis of total DNA from forty-six local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud.

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	条带总数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band
ISSR01	GTGCGTGCCTGCCGTGC	54	6	6	100.00
ISSR02	GAGAGAGGAGGC	54	10	6	60.00
ISSR03	CTCTCTCTCTCTCTTG	51	6	4	66.67
ISSR04	AGAGAGAGAGAGAGTA	54	9	7	77.78
ISSR05	GAGAGAGAGAGAGG	54	11	5	45.45
ISSR06	AGAGAGAGAGAGAGTC	54	8	5	62.50
ISSR07	CTCTCTCTCTCTCTAC	54	7	5	71.43
ISSR08	GTGCTCGTCGTCGTCGTC	54	6	6	100.00
ISSR09	CTCTCTCTCTCTCC	60	6	4	66.67
ISSR10	TGTGTGTGTGTGTGGT	54	7	7	100.00
ISSR11	CTCTCTCTCTCTCTGC	54	5	5	100.00
ISSR12	AGAGAGAGAGAGAGTC	54	7	5	71.43
ISSR13	CTCTCTCTCTCTGC	45	6	6	100.00
ISSR14	AGAGAGAGAGAGTC	42	9	6	66.67
ISSR15	AGAGAGAGAGAGTA	40	6	4	66.67
合计 Total			109	81	
平均 Average			7.3	5.4	74.31

2.2 基于 ISSR 标记的聚类分析结果

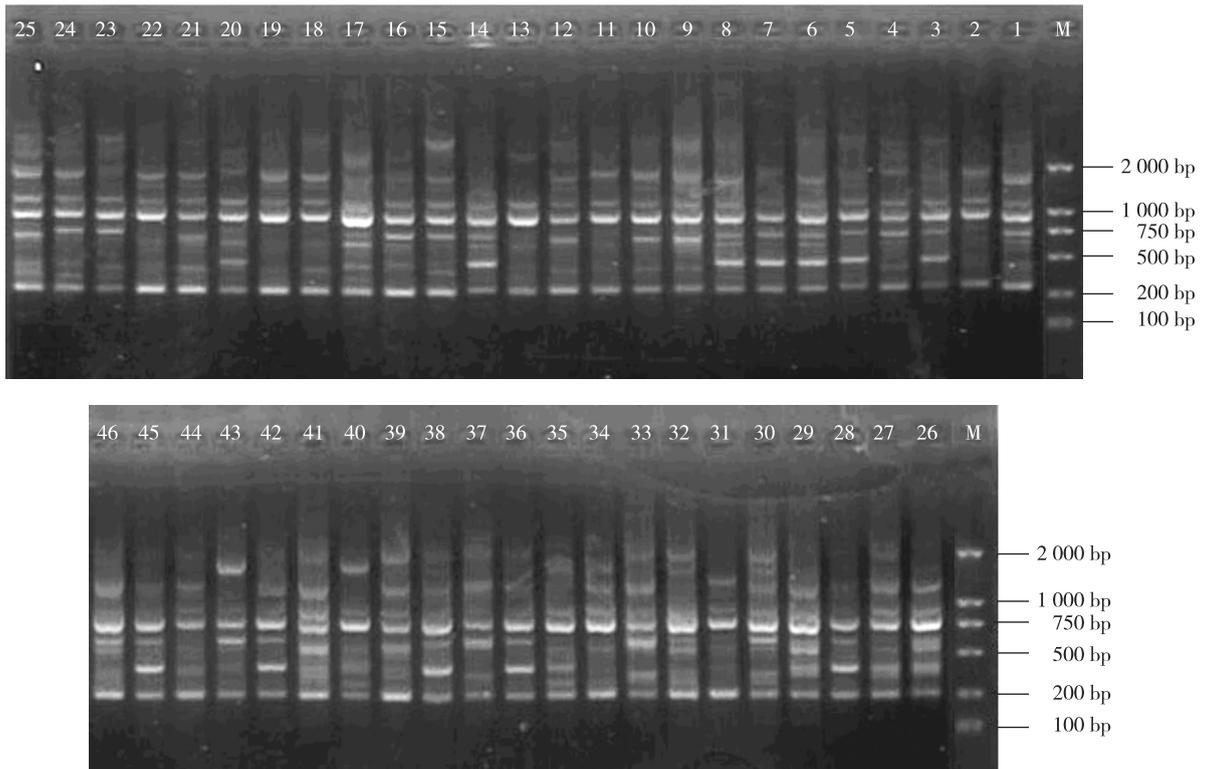
以 46 个鲁桑地方品种总 DNA 的 ISSR-PCR 扩增反应产生的 81 条多态性条带为基础数据,计算各地方品种间的遗传相似系数,结果表明,46 个地方品种间的遗传相似系数变异范围为 0.602 ~ 0.898,平均遗传相似系数为 0.750。由于实验所涉及的鲁桑地方品种均为山东省和河北省典型的地方品种,这 2 个省份毗邻且不排除相互引种的可能性,因此,计算出的平

均遗传相似系数相对偏大。其中,品种‘莱芜接桑’和‘梧桐桑’以及品种‘小鸡冠’和‘三岔黄鲁’间的遗传相似系数最大,为 0.898,表明它们之间的遗传距离最小,亲缘关系很近;来源于河北的品种‘冀丰’和山东的品种‘新泰打桑’的遗传相似系数最小,仅为 0.602,表明二者间的遗传距离最大,亲缘关系最远。

基于鲁桑不同地方品种间的遗传相似系数,采用 UPGMA 法进行了聚类分析,结果见图 2。由图 2 可

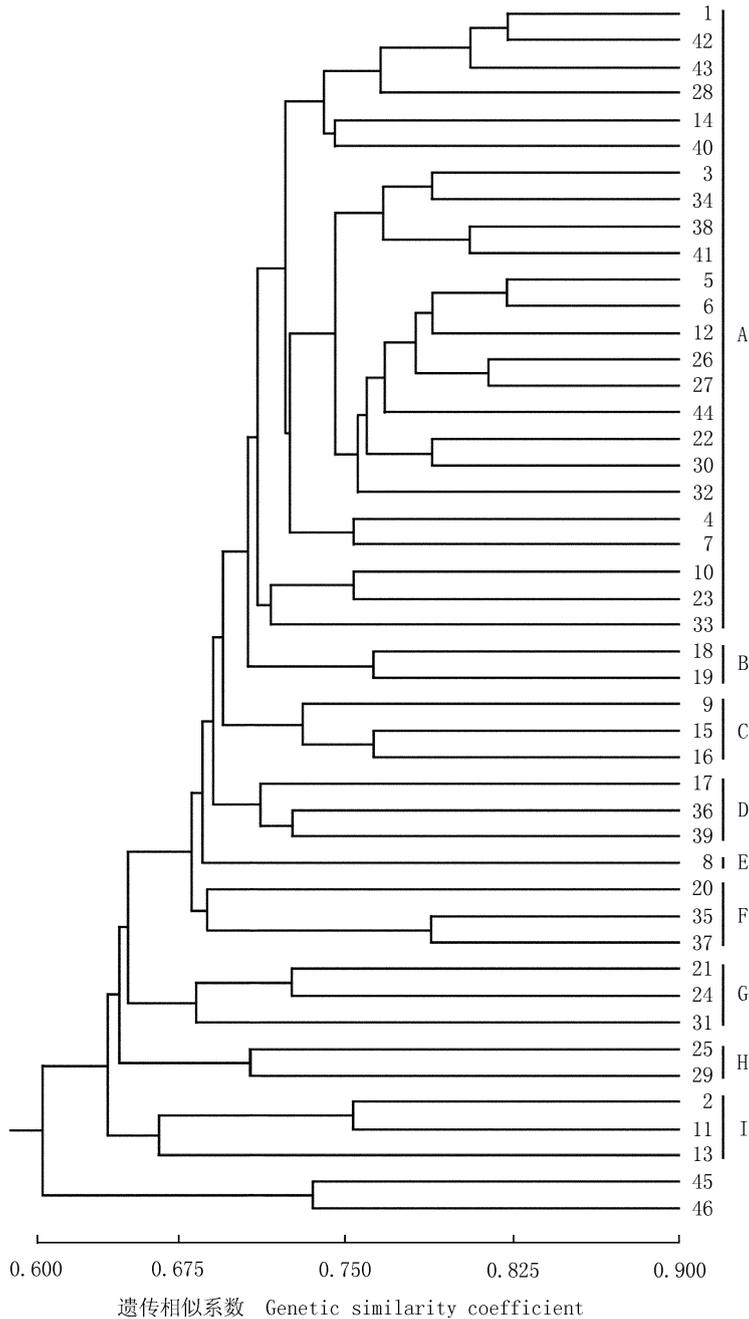
见,在遗传相似系数约 0.637 处,供试的 46 个鲁桑地方品种(40 个为山东地方品种,6 个为河北地方品种)被划分成 2 大类。其中,品种‘冀丰’和‘冀黄鲁选’为河北省地方品种,且均为雌株,被聚在一起成为第 1 大类;其余 44 个地方品种聚为第 2 大类,该大类包括 40 个来自山东省的鲁桑地方品种和 4 个来自河北省的鲁桑地方品种。综合各地方品种的产地、性状及遗传相似性系数,可进一步将第 2 大类的 44 个地方品种细分为 9 个亚类,分别为 A、B、C、D、E、F、G、H 和 I 亚类。其中, A、E、F、G、H 和 I 亚类共包含了 36 个地方品种,全部为原产山东省的鲁桑地方品种,占供试的山东鲁桑地方品种数(40 个)的 90%;划归

B、C 和 D 亚类的地方品种均包含了分别来自山东省和河北省的地方品种,其中, B 亚类包含了来自河北深县的品种‘碗桑’和来自山东蒙阴的品种‘红条瓣桑’, C 亚类包含了来自河北宽城的品种‘椴楞桑’、来自河北深县的品种‘深县黄鲁’和来自山东青州的品种‘益都大白条’, D 亚类包含了来自河北深县的品种‘大碗桑’以及来自山东临朐的品种‘选 792’和‘黄鲁头’;此外, E 亚类较为特殊,仅包含 1 个品种,即产自山东蒙阴的品种‘白条瓣桑’,是 46 个供试品种中唯一的 1 个三倍体品种,在遗传特性上具有明显的特殊性。



M: 分子量标记 Marker; 1: 大鸡冠 Dajiguan; 2: 小黄桑 Xiaohuangsang; 3: 青黄桑 Qinghuangsang; 4: 昌维维鲁 Changweiheilou; 5: 莱芜接桑 Laiwujiesang; 6: 梧桐桑 Wutongsang; 7: 银红椴鸡冠 Yin hongshenjiguan; 8: 白条瓣桑 Baitiaopisang; 9: 益都大白条 Yidudabaitiao; 10: 昌维大白条 Changweidabaitiao; 11: 新泰打桑 Xintaidasang; 12: 羊角弯 Yangjiaowan; 13: 黑鲁接桑 Heilujiesang; 14: 铁干桑 Tiegansang; 15: 椴楞桑 Beilusang; 16: 深县黄鲁 Shenxianhuanglu; 17: 大碗桑 Dawansang; 18: 碗桑 Wansang; 19: 红条瓣桑 Hongtiaopisang; 20: 营子桑 Yingzिसang; 21: 鸡冠一生子 Jiguanyishengzi; 22: 大叶一生子 Dayeyishengzi; 23: 龙头桑 Longtousang; 24: 黑鲁桑 Heilusang; 25: 邹平黄鲁 Zoupinghuanglu; 26: 沂水黄鲁头 Yishuihuanglutou; 27: 杨善黑鲁 Yangshanheilou; 28: 铁叶黄鲁桑 Tieyehuanglusang; 29: 打鲁桑 Dalusang; 30: 黑鲁头 Heilutou; 31: 滕州 872 Tengzhou 872; 32: 口头黑鲁 Koutouheilou; 33: 九山黑鲁 Jiushanheilou; 34: 周村黄鲁 Zhoucunhuanglu; 35: 驴耳桑 Lu'ersang; 36: 选 792 Xuan 792; 37: 黄鸡冠 Huangjiguan; 38: 黄芯采桑 Huangxincaisang; 39: 黄鲁头 Huanglutou; 40: 沂源黄鲁头 Yiyuanhuanglutou; 41: 大鸡桑芽变 Dajisangyabian; 42: 小鸡冠 Xiaojiguan; 43: 三岔黄鲁 Sanchahuanglu; 44: 李召桑 Lizhaosang; 45: 冀丰 Jifeng; 46: 冀黄鲁选 Jihuangluxuan.

图 1 引物 ISSR04 对 46 个鲁桑地方品种总 DNA 的 ISSR 扩增图谱
Fig. 1 ISSR amplification pattern of total DNA from forty-six local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud. amplified by primer ISSR04



1: 大鸡冠 Dajiguan; 2: 小黄桑 Xiaohuangsang; 3: 青黄桑 Qinghuangsang; 4: 昌维黑鲁 Changweiheilu; 5: 莱芜接桑 Laiwujiesang; 6: 梧桐桑 Wutongsang; 7: 银红椹鸡冠 Yin hongshenjiguan; 8: 白条瓣桑 Baitiaopisang; 9: 益都大白条 Yidudabaitiao; 10: 昌维大白条 Changweidabaitiao; 11: 新泰打桑 Xintaidasang; 12: 羊角弯 Yangjiaowan; 13: 黑鲁接桑 Heilujiesang; 14: 铁干桑 Tiegansang; 15: 梓罗桑 Beiluosang; 16: 深县黄鲁 Shenxianhuanglu; 17: 大碗桑 Dawansang; 18: 碗桑 Wansang; 19: 红条瓣桑 Hongtiaopisang; 20: 营子桑 Yingzisang; 21: 鸡冠一生子 Jiguan yishengzi; 22: 大叶一生子 Dayeyishengzi; 23: 龙头桑 Longtousang; 24: 黑鲁桑 Heilusang; 25: 邹平黄鲁 Zoupinghuanglu; 26: 沂水黄鲁头 Yishuihuanglutou; 27: 杨善黑鲁 Yangshanheilu; 28: 铁叶黄鲁桑 Tiejehuangsang; 29: 打鲁桑 Dalusang; 30: 黑鲁头 Heilutou; 31: 滕州 872 Tengzhou 872; 32: 口头黑鲁 Koutouheilu; 33: 九山黑鲁 Jiushanheilu; 34: 周村黄鲁 Zhoucunhuanglu; 35: 驴耳桑 Lü'ersang; 36: 选 792 Xuan 792; 37: 黄鸡冠 Huangjiguan; 38: 黄芯采桑 Huangxincaisang; 39: 黄鲁头 Huanglutou; 40: 沂源黄鲁头 Yiyuanhuanglutou; 41: 大鸡桑芽变 Dajisangyabian; 42: 小鸡冠 Xiaojiguan; 43: 三岔黄鲁 Sanchahuanglu; 44: 李召桑 Lizhaosang; 45: 冀丰 Jifeng; 46: 冀黄鲁选 Jihuangluxuan.

图 2 基于 46 个鲁桑地方品种总 DNA ISSR 标记分析的 UPGMA 聚类图
 Fig. 2 UPGMA cluster dendrogram based on ISSR marker analysis of total DNA from forty-six local varieties of *Morus alba* var. *multicaulis* (Perrott.) Loud.

3 讨论和结论

买买提依明等^[18]对 16 个新疆地方桑树品种资源(包括 2 个引进的品种)进行了 RAPD 标记研究,发现新疆特有的桑树品种资源药桑与引进的品种‘西庆 1 号’和‘西庆 2 号’间的指纹图谱差异较大,表明不同桑树地方品种的遗传关系与其地理分布具有一定的相关性。在本研究中,利用 ISSR 分子标记对 46 个鲁桑地方品种进行进一步的划分,结果显示,鲁桑地方品种的各大类和各亚类与各地方品种的地理分布具有一定的关系,地理位置相近的品种遗传相似系数较大,一般被聚在一起。例如,来自山东各地的 40 个鲁桑地方品种均被聚入第 2 大类中,形态特征相似的鲁桑地方品种聚为同一个亚类,且很多来自同一个县。其中,A 亚类中的‘大鸡冠’和‘小鸡冠’都为来自山东临朐的鲁桑地方品种,均为雌雄同株;D 亚类中的‘选 792’和‘黄鲁头’以及 G 亚类中的‘鸡冠一生子’和‘黑鲁桑’也都为来自山东临朐的鲁桑地方品种,且形态特征相似;I 亚类中的‘小黄桑’和‘新泰打桑’也均为来自山东新泰的鲁桑地方品种。但 B、C 和 D 亚类分别由来自山东和河北的鲁桑地方品种组成,这一现象很可能与不同产地间的相互引种有关。

使用 15 个 ISSR 引物对 46 个来自山东和河北的鲁桑地方品种总 DNA 进行扩增反应,共扩增出 81 条多态性条带,多态性条带百分率为 74.31%,说明供试的鲁桑地方品种间具有丰富的遗传多样性。46 个鲁桑地方品种间的遗传相似系数为 0.602~0.898,数值偏大,这可能是由于河北和山东两省距离较近,且可能存在相互引种的现象。基于 ISSR 分子标记对供试的 46 个鲁桑地方品种进行聚类分析,获得的分组结果与不同品种的地理分布有一定的相关性,说明鲁桑地方品种间的亲缘关系与地理分布的远近有关。

参考文献:

[1] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国桑树品种志[M]. 1 版. 北京: 中国农业出版社, 1993.

[2] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国桑树栽培学[M]. 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.

[3] Vijayan K, Srivatsava P P, Nair C V, et al. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers[J]. *Plant Breeding*, 2006, 125(3): 298-301.

[4] Vijayan K, Chatterjee S N. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs[J]. *Euphytica*, 2003, 131(1): 53-63.

[5] Vijayan K, Awasthi A K, Srivastava P P, et al. Genetic analysis of Indian mulberry varieties through molecular markers[J]. *Hereditas*, 2004, 141(1): 8-14.

[6] Awasthi A K, Nagaraja G M, Naik G V, et al. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays[J]. *BMC Genetics*, 2004, 5: 1-9.

[7] 赵卫国, 苗雪霞, 黄勇平, 等. 桑树二倍体及其同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析[J]. *蚕业科学*, 2005, 31(4): 393-397.

[8] Zhao W G, Zhou Z H, Miao X X, et al. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* species (*Moraceae: Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2007, 16(2): 275-290.

[9] Zhao W G, Zhou Z H, Miao X X, et al. Genetic relatedness among cultivated and wild mulberry (*Moraceae: Morus*) as revealed by inter-simple sequence repeat analysis in China[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2006, 86: 251-257.

[10] Zhao W G, Miao X X, Zang B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 851-860.

[11] Zhao W G, Pan Y L. Genetic diversity of genus *Morus* revealed by RAPD markers in China[J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2004, 6: 950-954.

[12] 赵卫国, 汪 伟, 潘一乐. 凤尾桑及其芽变品系间遗传变异的 ISSR 分析[J]. *蚕桑通报*, 2006, 37(3): 27-29.

[13] 赵卫国, 汪 伟, 杨永华, 等. 我国不同生态类型桑树地方品种遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *蚕业科学*, 2008, 34(1): 1-5.

[14] Zhao W G, Zhang J Q, Wang Y H, et al. Analysis of genetic diversity in wild populations of mulberry from western part of northeast China determined by ISSR markers [J]. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 2006, 17(4): 196-203.

[15] Kar P K, Srivastava P P, Awasthi A K, et al. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2008, 4(1): 75-83.

[16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemistry Bulletin*, 1987, 19: 11-15.

[17] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(10): 5269-5273.

[18] 买买提依明, 吴丽莉, 郭洪荣, 等. 新疆桑种质资源随机扩增 DNA 多态性(RAPD)研究[J]. *蚕业科学*, 2004, 30(1): 76-79.