

紫、红黄肉甘薯种质遗传多样性的 ISSR 分析

黄洁¹, 甘学德^{1,2}, 苏明^{1,2}, 李开绵¹, 叶剑秋¹

(¹中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南儋州 571737;

²海南大学农学院, 儋州 571737)

摘要:采用 ISSR 分子标记, 分析了 21 份紫肉、28 份红黄肉甘薯种质遗传多样性。结果表明: 17 对引物共扩增出 154 条谱带, 其中多态性谱带 138 条, 占 89.6%, 平均每个引物扩增出 8.12 条多态性谱带, 表现出丰富的多态性。聚类分析和主成分分析将 49 份甘薯种质聚为 4 大类, 类型间遗传差异较大, 将红黄薯单独聚为 1 类, 说明紫薯和红黄薯分别具有明显不同的来源和系统演化关系。种质间的遗传相似系数变幅为 0.58 ~ 0.93, 其中, 0.61 ~ 0.70 之间的种质占 51.4%, 0.71 ~ 0.80 之间的占 44.0%。而邻近地域育种单位或同一育种单位的品种亲缘关系较近。对如何在育种中利用这些优异种质进行了讨论。

关键词:甘薯; 种质; 遗传多样性; ISSR

Genetic Diversity Analysis through ISSR Markers for Purple, Red and Yellow Sweetpotato Varieties

HUANG Jie¹, GAN Xue-de^{1,2}, SU Ming^{1,2}, LI Kai-mian¹, YE Jian-qiu¹

(¹Tropical Crops Genetic Resources Institute, CATAS/ Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737; ²Collage of Agronomy, Hainan University, Danzhou 571737)

Abstract: The genetic diversity of 21 purple and 28 red and yellow sweetpotato varieties has been evaluated by ISSR markers. There were 138 polymorphic alleles, 89.6% out of 154 amplified loci based on 17 selected ISSR primers with average 8.12 alleles each primer that shown a rich genetic diversity among the population. Clustering and principal component analysis showed that the all 49 sweetpotato clones had been divided into 4 groups with higher genetic distance among groups, and the red and yellow meat types have been ascribed into group II. It indicated that there were different evolutionary relationship of purple, red and yellow sweetpotato germplasm. The coefficient of genetic conformability of all varieties were 0.58 – 0.93, 51.4% of germplasm were 0.61 – 0.70 and 44.0% of germplasm were 0.71 – 0.80. There was closer genetic relationship of the varieties come from the same or the nearby regions or breeding institute. It is discussed that how to use these varieties in sweetpotato breeding.

Key words: Sweetpotato; Varieties; Genetic diversity analysis, Inter-Simple Sequence Repeat(ISSR)

甘薯种质资源遗传背景复杂, 传统的形态学分类方法, 很难对繁杂的甘薯种质资源亲缘关系进行精确分类, 导致亲本选配费时费工、易出错^[1-2]。ISSR 标记是基于 PCR, 根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计单一引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增而发展起来的一种标记技术^[3]。ISSR 标记结合 RAPD 和 SSR 的优点, 具有模板用量少、多态性高、实验成本较低、操作简单、实验稳定性较高和结果可靠等优点^[4-5]。贺学勤等^[6]

用 RAPD、ISSR 和 AFLP 标记对系谱关系明确的 7 个甘薯品种进行亲缘关系分析, ISSR 标记产生的聚类图与系谱图最吻合, 认为目前 ISSR 标记最适于分析甘薯品种的亲缘关系。贺学勤等^[7]用 RAPD、ISSR 及 AFLP 分子标记, 对来自中国安徽、福建、河南和广东的 48 个甘薯地方品种进行遗传多样性分析, 从分子水平揭示中国是甘薯的次生多样性中心, 广东是中国甘薯的最早引入地, 在甘薯育种时应重点考虑广东地方品种的利用。李强等^[8]用 ISSR 和

AFLP 分子标记手段,对中国不同时期不同甘薯种植区的 26 份主要育成品种进行遗传多样性和遗传趋势分析,表明中国甘薯主要育成品种的遗传多样性程度低,遗传相似程度高,遗传基础狭窄,因此,在甘薯遗传改良中,可通过加强不同薯区育种亲本的交换,逐步改变目前中国育成品种遗传基础狭窄的局面。近年来,热带作物品种资源研究所从国内外收集大量的甘薯种质资源^[9],利用 ISSR 标记对其优选甘薯种质进行遗传多样性研究,明晰其亲缘关系,可以高效地进行亲本选配和种质保护。

表 1 49 份供试种质来源

Table 1 49 sweetpotato germplasm and their origins

编号 No.	种质名称 Germplasm name	来源地 Origin	编号 No.	种质名称 Germplasm name	来源地 Origin
A01	湛引 24	广东省湛江市农科所	B05	晋江广东薯	福建省晋江市
A02	文昌 27	海南省文昌市	B06	黄流 1 号	海南省乐东县黄流镇
A03	黄流 4 号	海南省乐东县黄流镇	B07	龙薯 10 号	福建省龙岩市农科所
A04	万宁 10 号	海南省万宁市	B08	洋青 23	广东省湛江市洋青镇
A05	琼海 2 号	海南省琼海市	B09	临高 36	海南省临高县
A06	晋江薯 3	福建省晋江市	B10	福薯 5 号	福建省农科院耕作所
A07	五指山 5 号	海南省五指山市	B11	桂粉 1 号	广西玉米所
A08	万宁大茂 3	海南省万宁市大茂镇	B12	湛薯 96-24	广东省湛江市农科所
A09	济薯 18	山东省农科院作物所	B13	湛引 10 号	广东省湛江市农科所
A10	徐 13-4	江苏徐州甘薯研究中心	B14	广薯 87	广东省农科院作物所
A11	京薯 6 号	北京农学院	B15	罗定连州 3	广东省罗定市连州镇
A12	湛薯 03-40	广东省湛江市农科所	B16	湛薯 93-16	广东省湛江市农科所
A13	徐紫 1 号	中国农科院甘薯研究所	B17	遂溪 2 号	广东省湛江市遂溪县
A14	农林 47	日本九州冲绳农研中心	B18	临高 24	海南省临高县
A15	广紫薯 2	广东省农科院作物所	B19	临高 13	海南省临高县
A16	京紫 15	北京农学院	B20	心香	浙江省农科院作物所
A17	湛引 42	广东省湛江市农科所	B21	广薯 111	广东省农科院作物所
A18	临高 17	海南省临高县	B22	泉薯 76	福建省泉州市农科所
A19	海南黑肉薯	海南省儋州市	B23	郑 20	河南省农科院作物所
A20	广薯 104	广东省农科院作物所	B24	广薯 79	广东省农科院作物所
A21	郑群紫 1	河南省农科院作物所	B25	维多丽	河北省农科院粮油所
B01	湛引 37	广东省湛江市农科所	B26	普薯 24	广东省普宁市农科所
B02	天鹅薯	广东省湛江市农科所	B27	广薯 92-66	广东省农科院作物所
B03	湛引 17	广东省湛江市农科所	B28	金山 57	福建农林科技大学
B04	儋州 10 号	海南省儋州市			

1.1.2 仪器和试剂 高速冷冻离心机(德国 Sigma)、电泳仪(Bio-red power PAC 3000)、电泳槽(Bio-Red Sequi Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell)、PCR 仪(Biometra T1 Thermocycler)、凝胶成像系统(德国 Biometra); Biophotometer 核酸蛋白分析仪(Eppendorf 公司)。Biowest agarose 琼脂糖、PVP、CTAB、Tris、EDTA、RNase 购自海南青峰生物科

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 2009 年 12 月,从热带作物品种资源研究所收集的 350 份甘薯种质资源中,优选 49 份供试种质,分别来源于我国 10 个省份和日本(表 1)。紫肉甘薯指薯块主肉色为紫色,共有 21 份紫肉甘薯种质,编为 A 系列;红黄肉甘薯指薯块主肉色为红或黄色,共有 28 份红黄肉甘薯种质,编为 B 系列。

技有限公司,100bp DNA Ladder Marker、2×Easy Taq PCR Super Mix、100bp plus DNA marker 购自北京全金式公司,GoldViewI 染料购自 Solabio 公司。结合前人文献^[10-11],从哥伦比亚大学公布的 100 条 IS-SR 引物中选出 23 条,由北京奥科生物公司合成(表 2)。

表 2 23 条 ISSR 引物序列

Table 2 23 primer sequence of Inter - Simple Sequence Repeat(ISSR)

UBC 编号 UBC code	引物序列 Primer sequence						
807	(AC) ₈ T	841	(GA) ₈ YC	861	(ACC) ₆	886	VDV(CT),
811	(AG) ₈ C	846	(CA) ₈ RT	864	(ATG) ₆	887	DVD(TC),
817	(GA) ₈ C	850	(GT) ₈ YC	874	(CCCT) ₄	888	BDB(CA),
819	(GT) ₈ A	853	(TC) ₈ RT	878	(GGAT) ₄	890	VHV(GT),
825	(AC) ₈ T	855	(AC) ₈ YT	880	(GGAGA) ₃	891	HVH(TG),
835	(AG) ₈ YC	857	(AC) ₈ YG	881	(GGCTG) ₄		

引物序列中, B = (C, G, T); D = (A, G, T); H = (A, C, T); R = (A, G); V = (A, C, G); Y = (T, C)

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 Huang 等^[11] 的 CTAB 法提取甘薯基因组 DNA, 在改良其蛋白除杂步骤的基础上, 用 8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, 用核酸蛋白仪测定 DNA 含量。

1.2.2 ISSR 扩增体系的建立 反应体系体积为 20 μl, 含: 10 μl 的 2 × Easy Taq PCR Super Mix、1 μl (50 ng) DNA、1 μl 10 μmol/L 引物和 8 μl ddH₂O。

1.2.3 ISSR 扩增条件和扩增产物的检测 ISSR 扩增反应条件和程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 45 个循环; 终延伸 7 min, 4℃ 保存^[6, 11]。扩增产物的检测: ISSR 扩增产物用含 GoldView 的 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 上样量 10 μl, 缓冲体系为 0.5 × TBE, 用 100 bp plus DNA marker。进行 100 V 电泳(槽长 34 cm), 在凝胶成像系统上观察记录结果, 分析扩增谱带。

1.2.4 数据分析方法 ISSR 扩增产物以电泳后的扩增条带清晰、重复性好为标准, 在相同迁移位置上(相同分子量片段), 把有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 建立矩阵表。用 NTSYS-pc 2.10y 软件计算遗传

表 3 筛选出的 17 条引物的扩增结果

Table 3 The amplification products generated by selected 17 primer

UBC 编号 UBC code	退火温度(℃) Annealing temperature	总谱带数 No. of total bands	多态性谱带 Polymorphic bands		UBC 编号 UBC code	退火温度(℃) Annealing temperature	总谱带数 No. of total bands	多态性谱带 Polymorphic bands				
			数量 Number	百分比(%) Percentage				数量 Number	百分比(%) Percentage			
			Percentage	Number								
807	50.5	10	10	100.0	855	50.0	8	8	100.0			
811	52.0	11	10	90.9	857	50.0	9	8	88.9			
817	51.5	7	7	100.0	861	55.0	7	4	57.1			
819	52.0	9	9	100.0	864	48.0	6	6	100.0			
825	52.5	5	5	100.0	880	49.0	12	12	100.0			
835	51.5	7	7	100.0	886	52.0	10	8	80.0			
841	51.5	14	14	100.0	887	50.0	9	6	66.7			
846	50.0	7	5	71.4	891	51.0	11	7	63.4			
850	51.5	12	12	100.0	总计		154	138	89.6			

相似性系数, 对供试种质进行 UPGMA 聚类分析和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及扩增结果

利用优化的 ISSR 反应体系, 从 23 条引物中筛选出带型清晰、重复性好、稳定性强、多态性高、条带数量多的 17 条引物, 然后对 49 份甘薯种质进行群体遗传多态性扩增(表 3), 其中引物 811 的电泳图谱见图 1。共扩增出 154 条谱带, 其中, 138 条多态性谱带, 占总条带的 89.6%, 说明所用 ISSR 标记在甘薯遗传资源中具有较高的多态性, 适合于对其遗传多样性水平进行检测。每个引物检测出多态性谱带 4~14 条, 平均 8.12 条多态性谱带, 引物 841 产生 14 条多态性谱带, 而引物 861 是由 3 个碱基组成的串联重复, 特异性条带少。

2.2 聚类分析

用 NTSYS-PC 软件对 49 份甘薯种质资源的 ISSR UPGMA 聚类分析, 得到树状图(图 2)。各两种质间的相似系数范围在 0.58~0.93 之间, 相似

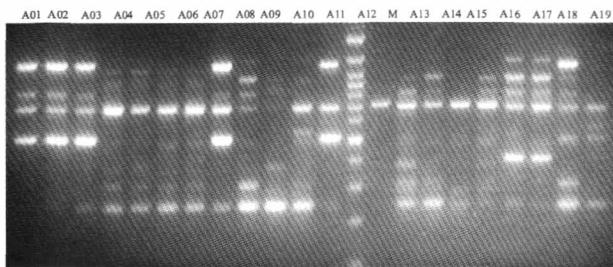


图 1 引物 811 对 A 系列的 PCR 扩增图谱
Fig. 1 The PCR amplification generated by primer UBC 811

系数分布在 0.61~0.70 之间的占 51.4%；其次，相似系数在 0.71~0.80 之间的占 44.0%。在遗传相似系数 0.70 处，将 49 份甘薯种质划分为四大类，从上至下编号为 I、II、III 和 IV。除个别紫薯品系外，紫薯被划归为 I 大类，红黄薯被划归为 II 大类，紫薯中的徐紫 1 号被划为 III 大类，京紫 15 和郑群紫 1 被划为 IV 大类。

从形态上观察，徐紫 1 号大薯率高，叶柄较长，高产；京紫 15 薯块干物率较高，茎和叶柄较粗；郑群紫 1 的叶片紫绿色，茎和叶柄较粗，分枝少。这 3 个紫薯品种与 I 大类紫薯有较大差异，说明其亲缘关系较远。薯肉红中带紫色的湛引 10 号被划为 I₅，这是由于湛引 10 号的薯肉色比较独特，薯肉基本色为橘红色，但薯心带少量紫色，从形态上也可说明湛引 10 号与紫肉甘薯的亲缘关系较近。总之，本研究的聚类分析把 49 份甘薯种质主要划归为紫薯和红黄薯 2 大

类，与形态上的薯肉颜色划分基本是一致的。

在遗传相似系数 0.74 处，将 I 大类划分为 6 小类 (I_{1~6})，将 II 大类划分为 7 小类 (II_{1~6})。在较多种质资源的 I₁、I₂、II₁、II₅ 和 II₆ 小类内，大部分种质的来源地靠近，同时，少量种质的来源地较远，这可能是不同地域间经长期引种交流后，提高了不同地域间的基因型相似度^[12]。从 350 份种质中优选出的 49 份的亲缘关系较近，这可能是大多数参试种质来源于近亲的亲本，导致新品种存在越来越高的遗传相似度。因此，迫切需要挖掘优异的甘薯新种质。明晰甘薯种质亲缘关系，将有利于提高甘薯杂交育种效率。

2.3 主成分分析

用 NTSYS - pc 2.10y 软件对 49 份种质的 ISSR 标记原始矩阵进行主成分分析，根据第 1、第 2 主成分作出 49 份材料的位置分布图(图 3)，紫薯(A)与红黄薯(B)明显分开。主成分分析表明，紫薯(A)与红、黄薯(B)具有不同的遗传结构，可以进一步说明它们分别具有不同的来源和亲缘发生关系。从图 3 中看，邻近地域的育种单位品种亲缘关系较近，如徐紫 1 号、京紫 15 和郑群紫 1。同一育种单位的品种亲缘关系较近，如红黄薯中的广薯 79 和广薯 87，以及紫薯中的京紫 6 号和京紫 15，这与聚类分析结果基本一致。因此在育种中要避免近亲杂交。

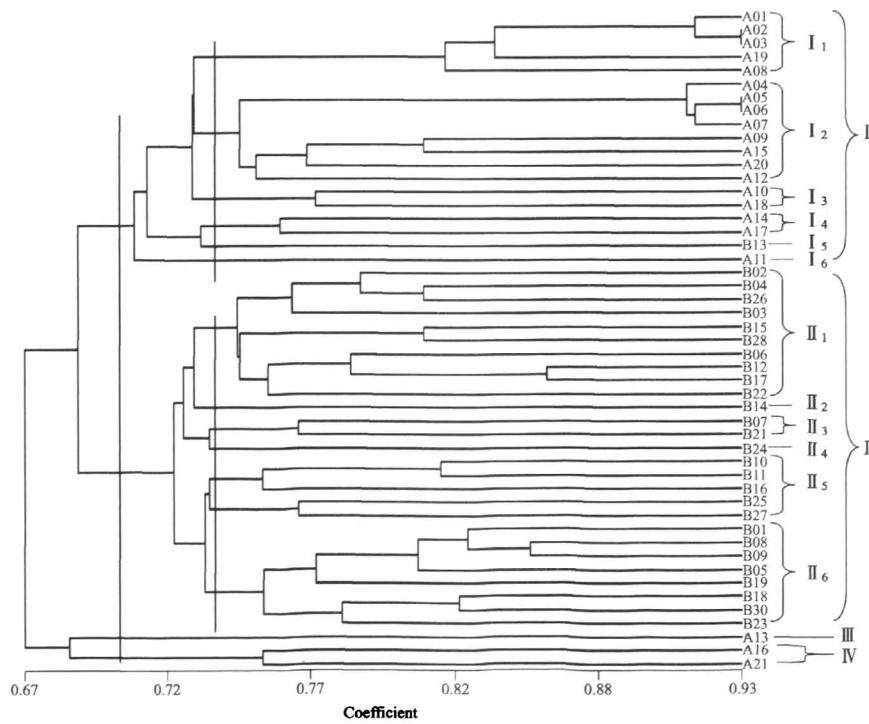


图 2 49 份甘薯种质聚类分析树状图
Fig. 2 The cluster analysis dendrogram of 49 sweetpotato germplasm

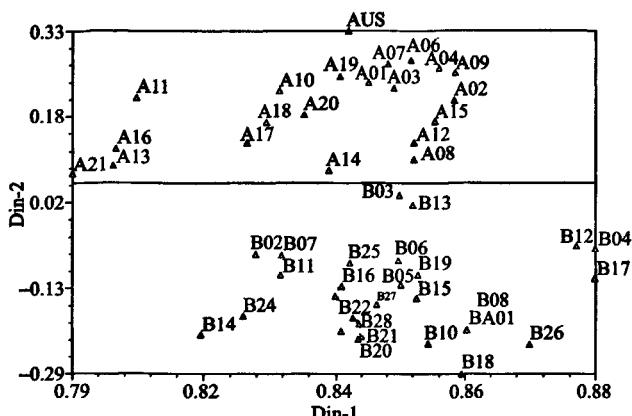


图3 49份甘薯种质的主成分分析

Fig. 3 The PCA results of 49 sweetpotato germplasm

3 讨论

3.1 ISSR 分子标记结果与育种

本试验采用 ISSR 分子标记,选取 17 条 ISSR 引物,对 49 份甘薯种质进行遗传多样性分析,共扩增出多态性谱带 138 条,占总条带的 89.6%,平均每个引物扩增出 8.12 条多态性谱带,表现出丰富的多态性,基本鉴别出种质间的亲缘关系。聚类分析和主成分分析把 49 份甘薯种质聚为 4 大类,与薯肉色的分类接近,说明紫薯和红黄薯分别具有明显不同的来源和系统演化关系。因此,用 ISSR 分子标记进行甘薯种质遗传多样性分析是可行的^[6,10]。其结果说明采用不同类型之间种质杂交可以获得较强的杂种优势,可避免近亲杂交。选配遗传相似系数低即亲缘关系较远的优异甘薯种质作为杂交亲本,有利于育成综合远亲优良性状的新品种^[7-8,13]。

3.2 电泳检测方法对扩增条带数的影响

每个引物检测出多态性谱带 4~14 条,平均 8.12 条,与张奕^[1]的平均 7.66 条和易燚波^[14]的平均 8.13 条近似,与罗文彬等^[4]的平均 26.7 条和李强等^[10]的平均 28.8 条相差较大,差异原因在于本试验采用了琼脂糖凝胶电泳检测,而李和罗采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。琼脂糖凝胶电泳具有操作简便,但灵敏度较低(约 100 bp)、需要较多引物

等特点,亦适合于遗传多样性分析^[1,14]。而聚丙烯酰胺凝胶电泳检测具有灵敏度高(约 5 bp)、所得多态性位点较多、需要较少引物等特点^[4,10]。

使用 GoldView 染胶法^[15],Mix 试剂采用蓝色染料,反应完成后直接电泳,结果条带清晰可辨。说明用 Mix 试剂和 GoldViewI 核酸染料进行甘薯种质遗传多样性分析是可行的。

参考文献

- [1] 张奕. 甘薯品种亲缘关系的 RAPD 和 ISSR 分子标记分析 [D]. 福州:福建农林大学,2007
- [2] 吴秋云,罗文彬,邱永祥,等. 一种快速提取甘薯基因组 DNA 方案的建立 [J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2006,26(2):119-120,124
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183
- [4] 罗文彬,蔡南通,邱永祥,等. 甘薯种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(10):110-114
- [5] 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
- [6] 贺学勤,刘庆昌,翟红,等. 用 RAPD、ISSR 和 AFLP 标记分析系谱关系明确的甘薯品种的亲缘关系 [J]. 作物学报,2005,31(10):1300-1304
- [7] 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
- [8] 李强,刘庆昌,马代夫,等. 中国甘薯主要育成品种的遗传多样性及遗传趋势 [J]. 江苏农业学报,2009,25(2):253-259
- [9] 宋付平,黄洁,刘国道. 甘薯种质资源在海南的收集与评价 [J]. 江西农业学报,2009,21(6):15-17
- [10] 李强,刘庆昌,翟红,等. 中国甘薯主要亲本遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 作物学报,2008,34(6):972-977
- [11] 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]. Theoretical and Applied Genetic, 2000, 100(7): 1050-1060
- [12] Simon T G, Maria B, Zhang D P, et al. Genetic diversity in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50(4): 429-437
- [13] 余华,蔡南通,邱永祥,等. 紫色甘薯品种主要性状及产量稳定性研究 [J]. 江西农业大学学报,2003,25(5):701-705
- [14] 易燚波. 利用 ISSR 标记对甘薯种质资源的遗传多样性分析 [D]. 重庆:西南大学,2008
- [15] 黄庆,府伟灵,赵渝徽,等. 核酸荧光染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性 [J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(11):1316-1318

紫、红黄肉甘薯种质遗传多样性的ISSR分析

作者:

黄洁, 甘学德, 苏明, 李开绵, 叶剑秋, HUANG Jie, GAN Xue-de, SU Ming, LI Kai-mian, YE Jian-qiu

作者单位:

黄洁, 李开绵, 叶剑秋, HUANG Jie, LI Kai-mian, YE Jian-qiu(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南儋州, 571737), 甘学德, 苏明, GAN Xue-de, SU Ming(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南儋州571737; 海南大学农学院, 儋州571737)

刊名:

植物遗传资源学报 

英文刊名:

Journal of Plant Genetic Resources

年, 卷(期):

2011, 12(4)

参考文献(15条)

1. 黄庆;府伟灵;赵渝徽 核酸荧光染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性 2006(11)
2. 易燚波 利用ISSR标记对甘薯种质资源的遗传多样性分析 2008
3. 余华;蔡南通;邱永祥 紫色甘薯品种主要性状及产量稳定性研究 2003(05)
4. Simon T G;Maria B;Zhang D P Genetic diversity in sweetpotato [Ipomoea batatas(L.)Lam.] in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers 2003(04)
5. 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 2000(07)
6. 宋付平;黄洁;刘国道 甘薯种质资源在海南的收集与评价 2009(06)
7. 李强;刘庆昌;马代夫 中国甘薯主要育成品种的遗传多样性及遗传趋势 2009(02)
8. 贺学勤;刘庆昌;王玉萍 中国甘薯地方品种的遗传多样性分析 2005(02)
9. 李强;刘庆昌;翟红 中国甘薯主要亲本遗传多样性的ISSR分析 2008(06)
10. 张奕 甘薯品种亲缘关系的RAPD和IsSR分子标记分析 2007
11. 程春明;石云素;宋燕春 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 2005(02)
12. 罗文彬;蔡南通;邱永祥 甘薯种质资源遗传多样性的ISSR分析 2008(10)
13. Zietkiewicz E;Rafalski A;Labuda D Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification 1994(02)
14. 吴秋云;罗文彬;邱永祥 一种快速提取甘薯基因组DNA方案的建立 2006(02)
15. 贺学勤;刘庆昌;翟红 用RAPD、ISSR和AFLP标记分析系谱关系明确的甘薯品种的亲缘关系 2005(10)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczxb201104027.aspx