

22 个甘薯品种的 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析

张安世,许会才,王育水
(焦作师范高等专科学校 理工学院 生物系,河南 焦作 454003)

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术,构建了 22 个甘薯品种的 DNA 指纹图谱并进行了遗传多样性分析。从 40 条 ISSR 引物中筛选了 12 条引物进行 PCR 扩增,共扩增出 94 条带,平均每条引物扩增 7.83 条带,多态性条带 69 条,多态性比率为 73.40%。将其中 3 条引物 UBC8、UBC35(1)和 UBC41 结合起来,构建了 22 个甘薯品种的指纹图谱。聚类分析显示,在阈值为 23 时,可将 22 个甘薯品种分为 4 类,其中,部分品种的 ISSR 分析与已知系谱相符或与地理分布有一定的相关性。
关键词: 甘薯; ISSR; 指纹图谱; 遗传多样性
中图分类号: Q943;S531 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0011-05

Construction of Fingerprinting and Analysis of Genetic Diversity with ISSR Markers for 22 Sweet Potato Varieties

ZHANG Anshi, XU Huicai, WANG Yushui
(Department of Biology, School of Science, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454003, China)

Abstract: The DNA fingerprinting of 22 sweet potato varieties were constructed using ISSR makers, and genetic diversity was analyzed. From 40 pairs of ISSR primers, 12 pairs of primers were selected to amplify, and 94 bands were obtained, on the average, each pair of primer was amplified to 7.83 bands, 69 polymorphic bands were obtained, the polymorphic percentage of bands was 73.40%. By combining three pairs of primer UBC8, UBC35(1) and UBC41, 22 sweet potato species fingerprinting were constructed. The cluster analysis showed that 22 sweet potato species could be classified into four kinds when threshold was 23, among them ISSR analysis of partial species agreed with pedigree, or related to geography places.
Key words: sweet potato; ISSR; fingerprinting; genetic diversity

甘薯是世界上重要的粮食、饲料、工业原料及新型能源作物,富含蛋白质、淀粉、β-胡萝卜素等^[1],在世界粮食生产中总产量排列第 7 位^[2]。我国是世界上最大的甘薯生产国,产量在粮食作物中仅次于水稻、小麦和玉米^[3],具有重要的经济价值。甘薯属于同源六倍体作物,染色体数量多,遗传背景复杂,存在自交不亲和以及同一不孕群内品种间杂交不亲和性^[4],严重制约了甘薯生产的发展。同时,在甘薯的生产过程中经常出现品种间的混淆,使得品种鉴定困难,影响对品种的改良与育种^[5]。因

此,建立准确、简便的鉴定方法意义重大。
随着分子生物学的快速发展,DNA 分子标记技术已成为品种间的鉴定和指纹图谱构建的主要方法。目前,RAPD 和 SSR 等分子标记技术已在甘薯品种鉴定和指纹图谱构建中得到应用。王红意等^[6]采用 1 个 RAPD 引物即可将 30 个甘薯品种区分开,由此建立了我国 30 个甘薯品种的指纹图谱。McGregor 等^[7]用 RAPD 和 SSR 技术对 27 个甘薯品种进行了比较分析,利用获得的 DNA 标记对 4 个不同名称的品种进行了鉴定,结果显示,这 4 份材料为

同一品种。ISSR 分子标记技术也已应用在品种鉴定和 DNA 指纹图谱构建中。张冰雪等^[8]利用 3 条 ISSR 引物可以将 22 个贵州地方火龙果鉴别开来,由此构建了 22 份火龙果种质的 DNA 指纹图谱。谢玥等^[9]利用 7 条 ISSR 引物构建了 14 个红阳猕猴桃的指纹图谱。目前,利用 ISSR 分子标记技术在构建甘薯品种 DNA 指纹图谱中的应用还鲜有报道,为此,采用 ISSR 分子标记技术构建 22 个甘薯品种的指纹图谱并进行遗传多样性分析,以期为甘薯的分

类鉴定和甘薯育种工作中杂交亲本的选择提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 甘薯 22 个甘薯品种分别采自焦作市农林科学研究院和洛阳市农业科学研究所(表 1),取健康叶片于冰壶中带回实验室置于 - 80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

表 1 供试材料及来源

编号	品种名称	采集地	编号	品种名称	采集地
1	徐薯 25	河南洛阳	12	济薯 18	河南洛阳
2	徐薯 364	河南洛阳	13	商薯 19	河南焦作
3	徐薯 13 - 14	河南洛阳	14	京薯 6	河南洛阳
4	漯徐 24	河南洛阳	15	秦薯 648	河南洛阳
5	徐薯 27	河南焦作	16	冀薯 98	河南洛阳
6	徐薯 28	河南焦作	17	烟 0579	河南洛阳
7	徐薯 18	河南洛阳	18	齐宁 8	河南洛阳
8	徐薯 22	河南洛阳	19	维多利	河南洛阳
9	徐薯 781	河南洛阳	20	金华薯	河南洛阳
10	郑红 22	河南洛阳	21	豫薯 8	河南洛阳
11	苏薯 8	河南洛阳	22	凌紫薯	河南洛阳

1.1.2 试剂 2 × *Taq* MasterMix (含有 *Taq* DNA Polymerase、2 × *Taq* PCR Buffer、3 mmol/L MgCl₂ 和 400 μmol/L dNTP mix)购自北京康为世纪生物科技有限公司,ISSR 引物由金唯智生物科技(北京)有限公司合成。

1.1.3 仪器 主要仪器有 Biofuge primo R 型冷冻离心机、Nanodrop 1000 紫外分光光度计、PTC - 200 型 PCR 仪、G:box - hr 凝胶成像系统。

1.2 甘薯基因组 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法提取甘薯基因组 DNA^[10]。

1.3 引物筛选与 ISSR 分析

选用 40 条 ISSR 引物对供试材料进行扩增。反应体积 10 μL;DNA 1.4 μL(质量浓度为 20 ng/μL)、引物 0.9 μL(质量浓度为 30 mmol/μL)、2 × *Taq* MasterMix 5.1 μL、RNase - Free water 2.6 μL。扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,复性(复性温度依引物而定)1 min,72 ℃ 1.5 min,40 个循环;72 ℃

10 min。4 ℃ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶分离。

1.4 指纹图谱构建与聚类分析

选取条带清晰、多态性好的引物进行统计分析。以 1、0 表示同一引物的扩增产物在迁移距离相同的位置上条带的有、无,从而建立甘薯各品种的数字 DNA 指纹图谱,具体参考宋莎等^[11]的方法。利用 SPSS 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选与 ISSR 分析

以供试的 22 个甘薯材料对 40 条 ISSR 引物进行了筛选,最终选出条带清晰、多态性高、重复性好的 12 条引物。12 条 ISSR 引物共扩增 94 条带,平均每条引物扩增 7.83 条带。多态性条带 69 条,多态性比率为 73.40%。所用引物见表 2。

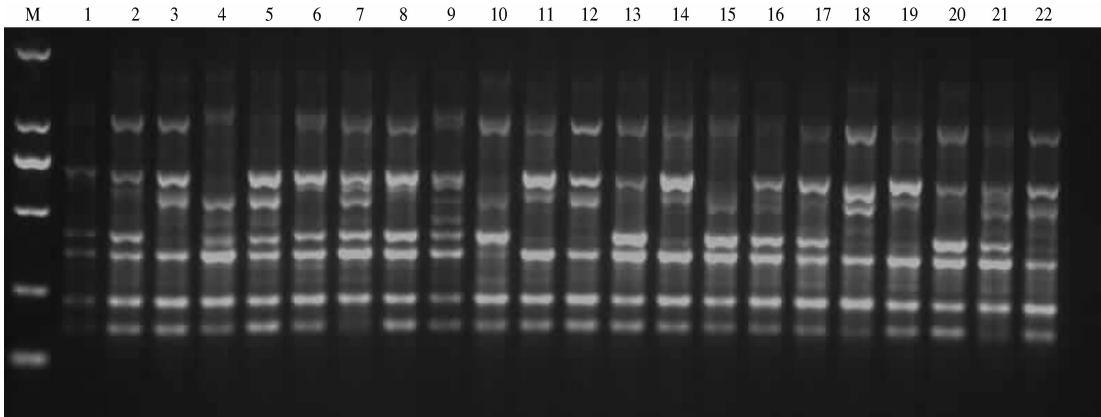
表 2 ISSR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	引物名称	引物序列(5'→3')
UBC7	AGAGAGAGAGAGAGT	UBC24	TCTCTCTCTCTCTCG
UBC8	AGAGAGAGAGAGAGC	UBC25	ACACACACACACACT
UBC10	GAGAGAGAGAGAGAT	UBC27	ACACACACACACACG
UBC12	GAGAGAGAGAGAGAA	UBC35(1)	AGAGAGAGAGAGAGCC
UBC17	CACACACACACACAA	UBC35(2)	AGAGAGAGAGAGAGTC
UBC18	CACACACACACACAG	UBC41	GAGAGAGAGAGAGACC

2.2 甘薯品种指纹图谱分析

在选定的 12 条引物中,利用其中 UBC8、UBC35(1)和 UBC41 等 3 条重复性好、多态性高的引物构建供试甘薯品种的 DNA 指纹图谱。3 条引物的扩增结果分别见图 1、图 2 和图 3。引物 UBC8 扩增片段长度在 150 ~1 013 bp,共扩增 8 条带,其中多态性

条带 6 条,多态性比率为 75.00%。引物 UBC35(1)扩增片段长度在 328 ~1 974 bp,共扩增 9 条带,全为多态性条带,多态性比率为 100.00%。引物 UBC41 扩增片段长度在 169 ~1 511 bp,共扩增 10 条带,其中多态性条带 6 条,多态性比率为 60.00%。



M:DNA Marker;1—22:22 个甘薯品种,下同
图 1 引物 UBC8 的 ISSR 扩增结果

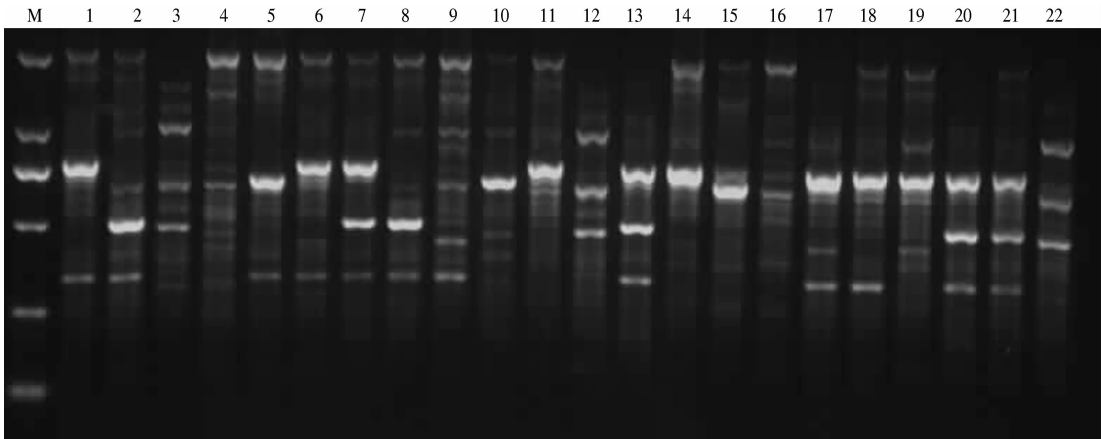


图 2 引物 UBC35(1) 的 ISSR 扩增结果

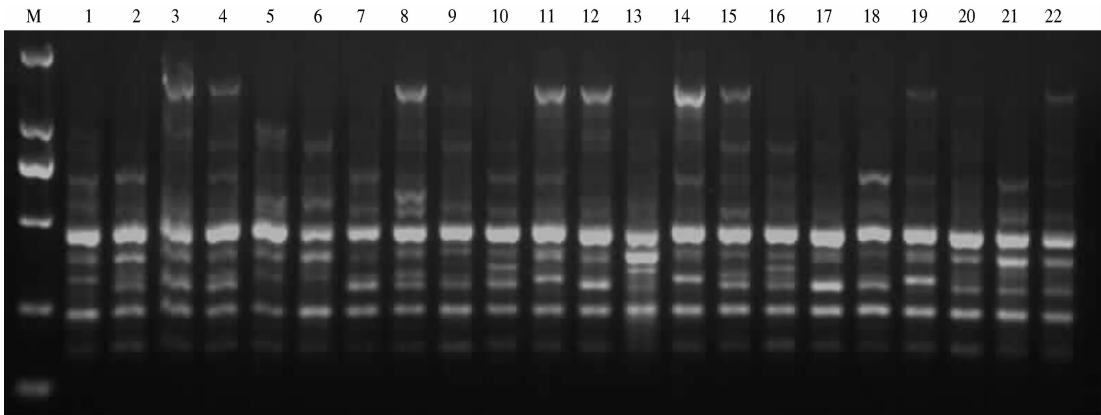


图 3 引物 UBC41 的 ISSR 扩增结果

在筛选出的 UBC8、UBC35(1)和 UBC41 等 3 条 ISSR 引物中,任何一条引物都只能区分部分品种,其中引物 UBC8 可以区分 8 个品种,引物 UBC35(1)

可以区分 14 个品种,引物 UBC41 可以区分 8 个品种。将 3 条引物组合在一起可区分 22 个甘薯品种,由此构建 22 个甘薯品种的数字指纹图谱(表 3)。

表 3 22 个甘薯品种的数字指纹图谱

品种编号	数字指纹																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
3	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
4	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
6	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
7	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
8	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
10	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
12	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
13	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
14	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
15	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
16	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
17	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
18	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
19	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
20	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
21	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
22	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1

注：数字指纹 1—27 分别表示 UBC8 - 1013、UBC8 - 645、UBC8 - 535、UBC8 - 464、UBC8 - 405、UBC8 - 336、UBC8 - 219、UBC8 - 150、UBC35(1) - 1974、UBC35(1) - 1496、UBC35(1) - 1078、UBC35(1) - 865、UBC35(1) - 778、UBC35(1) - 579、UBC35(1) - 500、UBC35(1) - 446、UBC35(1) - 328、UBC41 - 1511、UBC41 - 750、UBC41 - 636、UBC41 - 589、UBC41 - 451、UBC41 - 380、UBC41 - 335、UBC41 - 310、UBC41 - 242、UBC41 - 169。

2.3 甘薯品种的聚类分析

利用 SPSS 11.5 软件采用平均法进行聚类分析,结果见图 4。当聚类阈值确定为 23 时,可将供试品种分为 4 类。第 1 类:商薯 19、金华薯、徐薯 364、徐薯 25、徐薯 28、徐薯 18、豫薯 8、徐薯 27、徐薯 22 和徐薯 781;第 2 类:烟 0579 和齐宁 8;第 3 类:徐薯 13 - 14、济薯 18 和凌紫薯;第 4 类:苏薯 8、京薯 6、维多利亚、秦薯 648、冀薯 98、郑红 22 和漯徐 24。

6、维多利亚、秦薯 648、冀薯 98、郑红 22 和漯徐 24。

根据已知的系谱,亲缘关系较近的品种聚在一起。如商薯 19 和金华薯聚在了一起,它们具有共同的父本商薯 SL - 01。上述结果也能部分反映出供试品种的亲缘关系与地理分布有一定关系,如除徐薯 13 - 14 外,其余的徐薯系列都聚类在了第 1 类中。来源于山东的 2 个品种烟 0579 和齐宁 8 聚类在一起。但也有例外的情况,徐薯 25、徐薯 13 - 14 和徐薯 27 具有共同的亲本徐薯 18,但它们并未聚类在一起。这说明不同品种间遗传关系较为复杂,需要进一步研究分析。

3 结论与讨论

3.1 ISSR 技术在甘薯品种鉴定和指纹图谱构建中的作用

宋莎等^[11]利用 ISSR 技术,选择引物 827、M05 和 M083 可以有效区分 15 份苹果砧木资源,由此构建了 15 份苹果砧木资源的指纹图谱。葛亚英等^[12]利用 ISSR 技术,从筛选出的 12 条 ISSR 引物中,结合特异性条带扩增引物,选择了 U808、U835、U834 和 U825 等 4 条引物扩增的 28 个多态性位点建立了

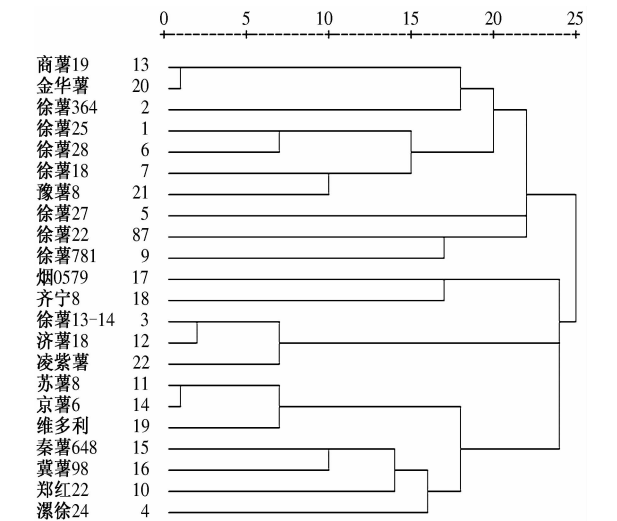


图 4 22 个甘薯品种的聚类图

41 个丽穗凤梨品种的分子指纹图谱,且每份资源都有唯一的指纹图谱,可以比较容易地将 41 个丽穗凤梨品种相互区分鉴别出来。张林等^[13]利用 ISSR 技术,选择引物 UBC835 和 UBC873 构建了供试的 62 个朱顶红品种的指纹图谱,其中 UBC835 可鉴定 50 个朱顶红品种,UBC873 可鉴定 44 个朱顶红品种,采用这一指纹图谱可对供试的所有朱顶红品种进行鉴定。

本研究利用 ISSR 技术,从 40 条 ISSR 引物中选择了 3 条引物成功的构建了 22 个甘薯品种的 DNA 指纹图谱,与前人的相关研究结果相似^[11-13]。

3.2 ISSR 技术在甘薯遗传多样性分析中的作用

ISSR 技术自发明以来,已经成为种质资源鉴定和遗传多样性研究中的主流技术之一。李强等^[14]利用 ISSR 技术对中国 62 份甘薯主要亲本进行了遗传多样性分析,结果说明,中国甘薯主要亲本遗传多样性较丰富,其中自育亲本与外引亲本之间遗传距离较远。季志仙等^[15]利用 ISSR 技术对 17 个甘薯品种进行了遗传多样性分析,结果表明,甘薯食用品种间具有较好的遗传多样性,但同类型品种间却又有较高的遗传相似性,这类品种需要引进或创制新资源。黄洁等^[16]利用 17 条 ISSR 引物对 21 份紫肉、28 份红黄肉甘薯种质资源进行遗传多样性分析,发现紫薯和红黄薯分别具有明显不同的来源和系统演化关系,且同一育种单位的品种亲缘关系较近。

本研究结果与上述研究结果有类似之处,如亲缘关系相近的品种聚在了一起。但本研究结果还提供了另外一些有价值的信息。有些亲本来源明确但无共同血缘关系的品种,在 ISSR 分析中聚在了一类。例如徐薯 13-14 与济薯 18,苏薯 8 与京薯 6,秦薯 648、冀薯 98 和郑红 22 等。这些信息对育种工作中亲本的选择具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 汤佳立,李宗芸,曹清河,等. DNA 分子标记在甘薯遗传育种研究中的应用[J]. 江苏农业科学,2009(4): 4-8.
- [2] 刘庆昌. 甘薯在我国粮食和能源安全中的重要作用[J]. 科技导报,2004(9):21-22.
- [3] 马代夫,李强,曹清河,等. 中国甘薯产业及产业技术的发展与展望[J]. 江苏农业学报,2012,28(5): 969-973.
- [4] 贺学勤,刘庆昌. 分子标记在甘薯育种中的应用[J]. 内蒙古农业大学学报,2004,25(4):125-127.
- [5] 陈新起,郑苗华,郑立涛,等. 菜用甘薯遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北农业学报,2009,18(5):186-188,203.
- [6] 王红意,翟红,王玉萍,等. 30 个甘薯主栽品种的 RAPD 指纹图谱构建及遗传变异分析[J]. 分子植物育种,2009,7(5):879-884.
- [7] McGregor C, Greyling M, Banda J, et al. DNA fingerprinting of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.): Two case studies in Africa [J]. Acta Horticulture, 2001, 546: 243-248.
- [8] 张冰雪,范付华,乔光,等. 贵州地方火龙果芽变种质 DNA 指纹图谱及遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 果树学报,2013,30(4):573-577.
- [9] 谢玥,潘美玲,庄启国,等. 红阳猕猴桃及其杂交后代的 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学,2013,32(1):76-82.
- [10] 张安世,邢智峰,刘永英,等. 苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学,2009,27(5): 559-562.
- [11] 宋莎,吴亚维,季祥彪,等. 贵州苹果砧木资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 华中农业大学学报,2013,32(1):19-24.
- [12] 葛亚英,张飞,沈晓岚,等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2012,45(4):726-733.
- [13] 张林,徐迎春,成海钟,等. 基于 ISSR 标记的 62 个朱顶红品种的遗传关系分析及指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(4):48-54.
- [14] 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.
- [15] 季志仙,王美兴,范宏环,等. 基于 ISSR 指纹的甘薯食用品种的遗传多样性分析[J]. 核农学报,2014,28(7):1197-1202.
- [16] 黄洁,甘学德,苏明,等. 紫、红黄肉甘薯种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(4):646-650.