DOI:10.11937/bfyy.201707026

杜鹃红山茶优良无性系遗传多样性的ISSR分析

徐 斌[1,2],廖焕琴[1,2],杨会肖[1,2],朱报著[1,2],潘 文[1,2],张方秋[1,2]

(1.广东省森林病虫害生物防治重点实验室,广东 广州 510520;2.广东省林业科学研究院,广东 广州 510520)

摘 要:以39个杜鹃红山茶优良无性系为试材,采用ISSR分子标记方法,研究杜鹃红山茶优良无性系遗传多样性。结果表明:杜鹃红山茶无性系遗传多样性较高,采用筛选的26个ISSR引物共扩增出211个位点,多态位点180个,多态位点百分率(*PPB*)为85.3%,有效等位基因数1.6,Nei's基因多样性指数(*H*)为0.345 1,Shannon多态性信息指数(*I*)为0.510 6,相似性系数为0.488 2～0.815 2,平均为0.668 8。UPGMA聚类分析得出,在遗传距离为0.360时,所有供试材料可以分为两大类:第Ⅰ类群是由4号和5号无性系组成,其它无性系构成第Ⅱ类群;当遗传距离为0.304时,又可将第Ⅱ类群分为6组。

关键词:杜鹃红山茶;无性系;遗传多样性;ISSR

中图分类号:S 685.14 **文献标识码**:A **文章编号**:1001－0009(2017)07－0127－05

杜鹃红山茶(*Camellia azalea*)属山茶科山茶属的常绿灌木或小乔木,又名张氏红山茶,仅分布于广东省阳春市鹅凰嶂自然保护区,有"植物界大熊猫"之称,是我国特有的山茶科濒危植物[1-2]。杜鹃红山茶四季常青,树形优美紧凑,花大而艳丽,花期长,4—12月均有花开放,具有很高的观赏价值,是培育四季茶花品种不可多得的优良亲本,也是一种名贵的木本花卉,在园林与观赏园艺方面具有广阔的应用前景[3-4]。目前,国内外非常重视杜鹃红山茶种质资源的收集[5-6],并开展了其种质资源的细胞学标记[7]、分子标记[6,8-9]、转录组[10]等方面的研究。当前,花卉市场杜鹃红山茶品种单一,花瓣5～7瓣,单瓣花,花型、树形都不够优美,亟需杜鹃红山茶产品的升级换代。

近年来,广东省林业科学院通过杜鹃红山茶新品种选育[3],发现了39个杜鹃红山茶优良无性系在花型、花径、花瓣数、花瓣颜色、叶子、树形紧凑性和抗逆性等方面都存在显著差异,在生产开发及研究上都具有巨大的利用价值。然而这39个无性系的谱系和亲缘关系尚不清楚,仅靠形态或表型难以准确评估这些无性系的变异水平,这必对今后优良无性系的选择利用、推广应用、杂交亲本选配等工作造成困难。该试验利用ISSR分子标记方法对已有的39个杜鹃红山茶优良无性系进行遗传多样性分析,旨在从分子水平上揭示其遗传多样性及其亲缘关系,为杜鹃红山茶新品种选育和种质资源的保护及开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据原产地杜鹃红山茶表型变异的调查结果,通过嫁接的方法,系统收集保存了39个杜鹃红山茶优良无性系,无性系编号为1～39号。采取杜鹃红山茶优良无性系枝条上端嫩叶39份作为供试材料,用蒸馏水清洗干净,用于DNA提取。

1.2 试验方法

选用植物DNA提取试剂盒(天根生物公司)提取杜鹃红山茶基因组DNA,通过琼脂糖凝胶电泳及紫外吸收值检测其浓度和纯度,并确定DNA的完整性。从加拿大哥伦比亚大学(UBC)设计的100条ISSR引物中筛选出26个扩增产物稳定、重复性好的引物,用于杜鹃红山茶样品的ISSR分析,引物序列见表1。PCR扩增的反应体系如下:反应体系25 μL,包括模板DNA 0.5 μL,10 mmol·L^{-1}引物1 μL,10× PCR buffer 2.5 μL,25 mmol·L^{-1} $MgCl_2$ 2.5 μL,10 mmol·L^{-1} dNTPs 0.75 μL,5 U·μL^{-1}

第一作者简介:徐斌(1974-),男,博士,教授级高级工程师,现主要从事观赏植物研究与开发利用等研究工作。E-mail:xubin@sinogaf.cn.

基金项目:广东省科技计划资助项目(2016A020206001)。

收稿日期:2016－12－07

Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,ddH_2O 17.55 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 10 min;扩增产物 4 ℃ 保存。采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.3　数据分析

根据每个样品扩增条件的有无,分别记作'1'与'0',仅记录清晰、可重复、长度在 200～2 000 bp 的扩增条带,形成 0/1 二元数据矩阵。利用 POPGENE 1.32 软件,计算多态位点百分数(*PPB*)、等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Shannon 多态信息指数(*I*)及 Nei's 遗传多样度(*H*)[11]。用 NTSYSpc2 软件进行 Dice 相似系数分析[12-13],并选择 UPGMA 法进行聚类分析构建树状聚类图。

表 1　杜鹃红山茶 ISSR 分析的引物及序列

Table 1　Primers and sequences for ISSR analysis

引物编号 Primer ID	引物序列 Primer sequence(5′-3′)	引物编号 Primer ID	引物序列 Primer sequence(5′-3′)
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	UBC846	CACACACACACACACART
UBC816	CACACACACACACACAT	UBC847	CACACACACACACACARC
UBC817	CACACACACACACACAA	UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
UBC819	GTGTGTGTGTGTGTGTA	UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	UBC855	ACACACACACACACACYT
UBC825	ACACACACACACACACT	UBC856	ACACACACACACACACYA
UBC826	ACACACACACACACACC	UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
UBC827	ACACACACACACACACG	UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	UBC873	GACAGACAGACAGACA
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA

2　结果与分析

2.1　扩增结果与遗传多样性

由表 2 可知,采用 26 条引物对 39 个杜鹃红山茶优良无性系基因组 DNA 进行 ISSR 分析,每条引物产生的位点数介于 3～16 个,26 条引物共检测到 211 个位点,平均每个引物检测到的位点数为 8,多态性位点 180 个,占比为 85.3%,其中 UBC810、UBC811、UBC824、UBC825、UBC827、UBC835、UBC850、UBC880 引物扩增多态位点比率达 100.0%。观测等位基因数为 1.9,有效等位基因数为 1.6,Nei 基因多样性指数为 0.345 1,Shannon 信息多样性指数为 0.510 6,表明参试的杜鹃红山茶无性系的遗传多样性较为丰富。

表 2　杜鹃红山茶的基因多样性

Table 2　Genetic diversity of *Camellia azalea* clones

引物 Primer	多态位点数 *Np*	多态位点比率 *PPB*/%	观测等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	Nei 基因多样性指数 *H*	Shannon 指数 *I*
UBC810	8	100.0	1.9	1.7	0.368 9	0.533 6
UBC811	4	100.0	1.9	1.6	0.360 4	0.530 0
UBC813	5	83.3	1.8	1.6	0.325 8	0.475 2
UBC814	6	85.7	2.0	1.8	0.441 0	0.630 9
UBC816	12	75.0	2.0	1.7	0.406 2	0.593 9
UBC817	10	90.9	2.0	1.7	0.413 1	0.601 6
UBC819	9	90.0	1.8	1.6	0.312 7	0.453 8
UBC824	11	100.0	2.0	1.5	0.344 5	0.526 8
UBC825	11	100.0	2.0	1.7	0.376 7	0.553 2
UBC826	9	81.8	1.5	1.3	0.187 8	0.281 4
UBC827	5	100.0	2.0	1.7	0.386 7	0.571 8
UBC829	11	91.7	1.9	1.4	0.246 8	0.389 6
UBC834	5	83.3	1.9	1.5	0.295 7	0.455 8
UBC835	5	100.0	2.0	1.6	0.347 1	0.524 7
UBC836	6	75.0	2.0	1.5	0.315 8	0.487 5
UBC844	9	75.0	2.0	1.7	0.401 1	0.586 6
UBC846	9	90.0	2.0	1.4	0.273 5	0.429 4
UBC847	5	71.4	1.8	1.6	0.347 0	0.501 6
UBC849	5	71.4	2.0	1.5	0.300 5	0.458 7
UBC850	3	100.0	1.9	1.5	0.325 9	0.490 0
UBC855	5	62.5	1.8	1.7	0.360 3	0.514 0
UBC856	2	66.7	2.0	1.7	0.390 7	0.567 7
UBC858	5	62.5	1.8	1.6	0.331 6	0.475 4
UBC866	6	85.7	1.9	1.7	0.377 9	0.540 7
UBC873	4	80.0	2.0	1.7	0.355 3	0.523 6
UBC880	10	100.0	2.0	1.8	0.422 2	0.611 4
总计/平均 Total/Average	180	85.3	1.9	1.6	0.345 1	0.510 6

2.2 杜鹃红山茶优良无系性的相似性与聚类分析

39份杜鹃红山茶无系性材料间的相似性系数为0.488 2～0.815 2,平均为0.668 8,其中,17号无性系与13号无性系相似性系数最大(0.815 2),它们之间遗传距离最近,而无性系数31号与9号之间相似性系数最小(0.488 2)。从相似性系数分析结果中还可以看出,无性系1、9、5号与其它大部分无性系之间的相似性系数都小于0.550 0,表明彼此存在较大的遗传差异。

应用NTSYSpc2软件,选择UPGMA法对杜鹃红山茶无性系进行聚类分析(图1),在遗传距离为0.360时,所有供试材料可以分为两大类:第Ⅰ类群是由4号和5号无性系组成,其它无性系构成第Ⅱ类群;当遗传距离为0.304时,又可将第Ⅱ类群分为6个组:第1组为30号无性系,第2组为32号无性系,第3组为25号无性系,第4组包括3、6、16号无系性,第5组包括1、2号无系性,其它无性系归为第6组。

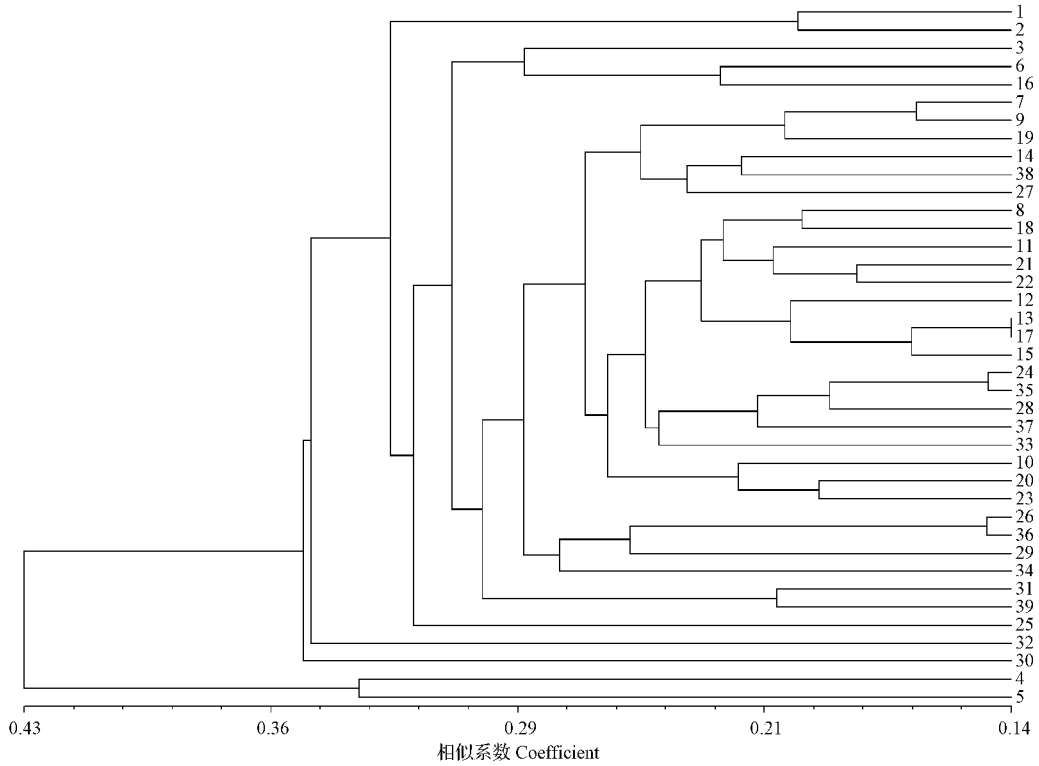

图1 杜鹃红山茶39个无性系的UPGMA聚类分析

Fig.1 Cluster analysis for 39 *Camellia azalea* clones

3 讨论与结论

3.1 杜鹃红山茶优良无性系的遗传多样性和聚类

普遍认为濒危的或分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低[14],然而,该研究通过对杜鹃红山茶原产地的39个优良无性系ISSR分析得到的多态位点百分率为85.3%,Nei基因多样性指数为0.345 1,Shannon信息多样性指数为0.510 6,与小果油茶(*Camellia meiocarpa*)[15]、红花荷(*Rhodoleia champi-onii*)[16]、秀雅杜鹃(*Rhododendron concinnum*)[17]、樱花(*Cerasus cultivars*)[18]、木棉(*Bombax ceiba*)[19]等植物一样,都具有较高的遗传多样性水平。通过对原产地杜鹃红山茶的表型性状的调查也发现,杜鹃红山茶具有较丰富的表型特征,具有不同的叶形、花型、花期、花瓣数量、花瓣大小、树枝分枝角度等,这与该研究中杜鹃红山茶DNA水平的遗传多样性相一致。杜鹃红山茶无性系具有较高的遗传多样性可能与其繁育系统为专性异交型、自交不亲和与典型的虫媒传粉型植物有关[20]。罗晓莹等[9]的杜鹃红山茶遗传多样性研究结果表明,杜鹃红山茶遗传多样性较低,物种水平上的多态位点百分率(*PPB*)为55.29%,Nei基因多样性指数(*H*)及Shannon多态性信息指数(*I*)分别为0.219 1和0.321 5。究其原因,可能与所选用植物个体和数量不同有关,具体原因有待进一步研究。

基于遗传距离的聚类分析表明,39 个杜鹃红山茶无性系分成 2 个类群,其中第Ⅱ类群又分为 6 个组。从各个类群和组的无性系个数来看,第Ⅰ类群、第Ⅱ类群的第 1、2、3、4、5 组的无性系较少,包括10 个无性系,说明这些无性系个体之间的遗传距离较大,而其它 29 个无性系都归为第Ⅱ类群第 6 组。分子标记的聚类结果,显示了杜鹃红山茶各无性系间的亲缘关系,对于正确评价杜鹃红山茶优良无性系的分类、保护与利用提供重要的数据支持。

3.2　杜鹃红山茶优良无性的选择与利用

山茶科植物杜鹃红山茶,具有四季开花的特性,在园林绿化、山茶新品种培育中具有重要开发和应用价值,由于其分布区域狭窄、人为干扰破坏严重,致使杜鹃红山茶已成为濒危种[21]。当前,国内外正掀起了一股对杜鹃红山茶开发利用的热潮,广东省林业科学研究院和广东棕榈股份有限公司都已选用杜鹃红山茶为亲本,大规模开展了山茶杂交新品种的培育。因此,对杜鹃红山茶资源的系统收集、评价与利用势在必行。在该研究从原产地系统收集的杜鹃红山茶优良无性系具有丰富的表型变异以及 DNA 的遗传多样性的特点,这些材料必将是大规模开发利用杜鹃红山茶、培育四季山茶杂交新品种的宝贵材料和重要亲本,特别是与其它大部分无性系之间的相似性系数较小的 1、9、5 号,以及聚类分析中的 4、5、30、32、25、1、2、3、6、16 号这些亲缘关系较远的无性系,均是今后研究保护利用的重要对象。

参考文献

[1] 张宏达.中国植物志[M].北京:科学出版社,1999:7.

[2] 卫兆芬.中国山茶属一新种[J].植物研究,1986,6(4):141-143.

[3] 张方秋,李小川,潘文,等.广东生态景观树种栽培技术[M].北京:中国林业出版社,2012:142-143.

[4] 张方秋,杨会肖,徐斌,等.杜鹃红山茶的光响应特性及其最适模型筛选[J].生态环境学报,2015,24(10):1599-1603.

[5] 徐斌,彭莉霞,杨会肖,等.杜鹃红山茶叶片主要性状的遗传多样性分析[J].植物研究,2015,35(5):730-734.

[6] 李辛雷.杜鹃红山茶遗传多样性及濒危机制[D].北京:中国林业科学研究所,2012.

[7] 王霜,王仲朗,梁静,等.濒危植物杜鹃红山茶的细胞学研究[J].云南植物研究,2007,29(6):665-658.

[8] 罗晓莹,唐光大,许涵,等.山茶科 3 种中国特有濒危植物的遗传多样性研究[J].生物多样性,2005,13(2):112-121.

[9] 罗晓莹,庄雪影,杨跃生.杜鹃红山茶遗传多样性的 ISSR 分析[J].热带亚热带植物学报,2007,15(2):93-100.

[10] FAN Z Q,LI J Y,LI X L,et al. Genome-wide transcriptome profiling provides insights into floral bud development of summer-flowering *Camellia azalea*[J]. Scientific Reports,2015(5):1-11.

[11] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1973,70(1):3321-3323.

[12] NEI M,TAJIMA F,TATENO Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data[J]. Journal of Molecular Evolution,1983,19(2):153-170.

[13] ROLF F J. NTSYS-pc:Numerical taxonomy and multivariate analysis system,version 2.1. Exeter Software[S]. New York:Setauket,2000.

[14] HAMRICK J L,GODT M J W,SHERMAN-BROYES S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. New Forests,1992,6(1-4):95-124.

[15] 黄勇.基于 SRAP 分子标记的小果油茶遗传多样性分析[J].林业科学,2013,49(3):43-50.

[16] 徐斌,朱报著,张方秋,等.红花荷天然群体的遗传多样性分析[J].植物研究,2014,34(4):479-484.

[17] 赵冰,徐曼,司国臣,等.秦岭秀雅杜鹃野生种群遗传多样性和遗传分化的 AFLP[J].应用生态学报,2012,23(11):2983-2990.

[18] 林立,王志龙,付涛,等.39 个樱花品种亲缘关系的 ISSR 分析[J].植物研究,2016,36(2):297-304.

[19] 彭莉霞,朱报著,杨会肖,等.广东省木棉种质资源 ISSR 遗传多样性分析[J].广东林业科技,2015,31(6):23-28.

[20] 罗晓莹,唐光大,莫罗坚,等.杜鹃红山茶的传粉生物学[J].生态学杂志,2011,30(3):552-557.

[21] 罗晓莹.杜鹃红山茶保护生物学研究[D].广州:华南农业大学,2006.

Genetic Diversity Analysis on *Camellia azalea* Superior Clones Based on ISSR Markers

XU Bin[1,2],LIAO Huanqin[1,2],YANG Huixiao[1,2],ZHU Baozhu[1,2],PAN Wen[1,2],ZHANG Fangqiu[1,2]

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Bio-control for the Forest Disease and Pest,Guangzhou,Guangdong 510520;2. Guangdong Academy of Forestry,Guangzhou,Guangdong 510520)

Abstract:*Camellia azalea* superior clones were used as test materials,the genetic diversity of *Camellia azalea* superior clones was evaluated by using ISSR markers. The results showed that the genetic diversity of *C. azalea* clones was abundant,a total of 211 bands were obtained in which 180 bands(85.3%) were polymorphic,the average effective number of alleles was 1.6,Nei′s gene diversity indices(H) was 0.345 1 and ShannonNei′s

DOI:10.11937/bfyy.201707027

葡萄柚成年态茎段外植体的消毒与抗褐化

刘　月,叶维雁,王樱潼,刘惠民,王连春

(西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室,云南 昆明 650224)

摘　要:以葡萄柚不同品种的成年态茎段为外植体,研究了不同茎段长度、品种、消毒方式及培养基对葡萄柚成年态茎段消毒以及防褐化的影响。结果表明:2 cm 大小茎段消毒效果最好,污染率最低,萌芽率最高。不同品种的污染率和发芽率存在差异,"里约红"污染率最低,"星路比"污染率较高,但萌芽率最高。用 75%酒精处理 20 s,5% NaClO 溶液处理 20 min,放置 48 h 后,再用 5% NaClO 溶液处理 20 min,污染率最低达 21.3%,为最佳消毒方法。NaClO 二次消毒后接种于 WPM+100 mg·L^{-1} 半胱氨酸培养基上可有效控制褐化,污染率最低为 15.6%,萌芽率最高为 83.1%。

关键词:葡萄柚;成年态外植体;消毒;褐化

中图分类号:S 666.303.6　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2017)07－0131－05

葡萄柚(*Citrus Paradisi* Macf)属芸香科柑橘属的植物,为世界柑橘四大类群之一,因果实悬挂成串簇生如葡萄,故称葡萄柚[1]。葡萄柚起源于西印度群岛的巴巴多斯,在欧美地区大量种植[2]。葡萄柚的营养价值丰富,果实柔嫩,风味独特,既可鲜食,又可加工制成罐头,果汁及色拉等原料[3-5],越来越受到世界各国的生产者和消费者的喜爱,因此发展葡萄柚种植具有可观的前景[6]。

由于葡萄柚生产过程中,长期进行无性繁殖,所以易感染病毒、类病毒。据不完全统计,世界上已经报道的柑橘病害病及类病毒病有 80 余种[7],其中危害较大的有 20 多种。如国内发生的柑橘黄龙病(liberobacter asiaticum)、衰退病(tristeza)、裂皮病(exocortis)[8]以及碎叶病(tatter leaf)等都极大的危害葡萄柚生产,这些危险性病毒病和类似病毒病可以通过嫁接代代相传,通过苗木接穗调运扩散蔓延,是葡萄柚高产优质的严重障碍[9-10]。柚类属于多年生木本植物,其组织培养的难度远比草本植物大,尤其是成年树的组织进行离体培养时,外植体消毒、诱导愈伤和根系的分化方面难度更大[11];柑橘属植物处于气候温和,雨水充足环境中,成年树在生长过程中携带大量的细菌和真菌,会出现消毒不彻底和过分消毒导致萌芽率低的现象。在沙田柚[12-14]、文旦柚、蜜柚[15]和近年来增加的葡萄柚[16-17]等柚类组培快繁研究中,都因为成年态外植体消毒难以解决而采用种子实生苗作为快繁材料。关于葡萄柚成年态外植体组织培养的无菌体系建立,目前国内尚鲜见相关研究。该试验以不同品种的葡萄柚的成年态茎段作为外植体,对葡萄柚外植体消毒方法进行筛选,以期解决接穗污染率高、褐变率高、萌芽率低的问题,为葡萄柚成年态外植体离体培养和茎尖微芽嫁接提供参考依据。

第一作者简介:刘月(1991-),女,云南昆明人,硕士研究生,研究方向为果树组织培养。E-mail:monkeymoon6@sina.com.

责任作者:刘惠民(1957-),男,博士,教授,现主要从事经济林栽培与利用等研究工作。E-mail:hmliu@swfu.edu.cn.

基金项目:西南林业大学科技创新基金资助项目(15088);国家国际科学合作专项资助项目(2014DFA3060)。

收稿日期:2016－12－15

information index(I) was 0.510 6, the genetic similarity coefficients among the tested clones ranged was 0.488 2－0.815 2, with an average of 0.668 8. Cluster analysis was conducted by using UPGMA method, it was concluded that the 39 clones of *C. azalea* could be divided into 2 groups(the genetic distance was 0.360), and the second group included 6 subgroups (the genetic distance was 0.304).

Keywords: *Camellia azalea*; clones; genetic diversity; ISSR