

红麻种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

谢 晓 美¹, 王 志 伟¹, 栗 建 光², 白 凤 虎³

(1. 保定职业技术学院,河北 保定 071051;2. 中国农业科学院 麻类研究所,湖南 长沙 410205;
3. 饶阳县农牧局,河北 衡水 053900)

摘 要:采用 ISSR 分子标记对 38 份红麻品种进行遗传多样性分析。利用自行筛选的引物共扩增出 117 条带,其中多态性条带 98 条,多态性条带比率为 83.7%。品种之间的遗传相似系数为 0.36~0.98,表明部分红麻品种间存在显著的遗传分化。聚类分析表明:红麻栽培品种间基因型差异较小,亲缘关系较近,遗传基础相对狭窄;而野生种、近缘种和栽培种之间存在着较大的遗传差异性。

关键词:红麻;种质资源;ISSR;遗传多样性;亲缘关系

中图分类号:S 563.5 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)18-0151-03

红麻(*Hibiscus camabinus*L. L.)锦葵科木槿属 1 a 生草本植物,是重要的韧皮纤维作物,其种质资源的遗传多样性非常丰富。对红麻品种亲缘关系的研究,前人多采用传统的形态学^[1]和细胞学^[2]研究方法,而 DNA 分子标记技术的出现将成为红麻品种选育和鉴别的有效手段。

ISSR 标记是由 Zietkiewicz^[3]创建的一种分子标记技术。ISSR 引物设计简单,且引物较长,退火温度较高,同时试验操作过程简单,不需使用同位素,这就增强了试验的可重复性,揭示了更高层次的 DNA 多态性。此标记已广泛应用在棉花、水稻、小麦^[4-6]等植物的亲缘关

系分析中,这些研究表明 ISSR 标记适用于种内、种间乃至属间的分类学研究。

该研究利用 ISSR 分子标记分析红麻栽培种、野生种和近缘种之间的亲缘关系,旨在为品种鉴定,优异种质基因的发掘、改良以及在杂种优势育种上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 38 份红麻品种(材料名称及来源见表 1)均取自中国农科院麻类研究所。其中栽培种 19 份,野生种 7 份,近缘种 12 份。

表 1

试验材料名称及来源

序号	品种	品种类型	来源地	序号	品种	品种类型	来源地
1	506-68	栽培种	辽宁	20	85-113	近缘种	坦桑尼亚
2	马红全叶	栽培种	广西	21	H070	近缘种	坦桑尼亚
3	海宁红麻	栽培种	浙江	22	H060	野生种	尼泊尔
4	722	栽培种	湖南	23	H193	近缘种	尼泊尔
5	云南元江	栽培种	云南	24	H027	野生种	肯尼亚
6	NL445	栽培种	尼泊尔	25	H106	野生种	坦桑尼亚
7	AS240	栽培种	澳大利亚	26	H102	野生种	坦桑尼亚
8	83-4	栽培种	印度	27	H335	近缘种	坦桑尼亚
9	TC179	栽培种	台湾	28	H208	近缘种	坦桑尼亚
10	S-57	栽培种	萨尔多瓦	29	H101A	近缘种	坦桑尼亚
11	ZF78	栽培种	南非	30	H204	近缘种	坦桑尼亚
12	F71	栽培种	法国	31	H321	近缘种	坦桑尼亚
13	299	栽培种	津巴布韦	32	H003	近缘种	肯尼亚
14	C2032	栽培种	古巴	33	H074	野生种	坦桑尼亚
15	伊朗裂叶	栽培种	伊朗	34	H030	野生种	坦桑尼亚
16	泰红 763	栽培种	泰国	35	H192	近缘种	尼泊尔
17	加纳 137	栽培种	加纳	36	H173	野生种	肯尼亚
18	青皮 1 号	栽培种	越南	37	85-106	近缘种	赞比亚
19	SD125	栽培种	苏丹	38	H377	近缘种	南非

第一作者简介:谢晓美(1980-),女,河北河间人,硕士,助教,现从事作物遗传育种研究工作。

收稿日期:2010-06-07

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 每份样品分别选取 10~15 粒供试材料的种子,置于培养箱中 28℃ 培养,待下胚轴长至 4~5 cm 时,切取下胚轴,液氮研磨,采用改良的

CTAB 法^[7]提取红麻基因组 DNA,用紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值,检测 DNA 的质量和浓度,并稀释到 10 ng/ μ L,放入 4℃ 冰箱中储存备用。

1.2.2 PCR 扩增反应体系 红麻 ISSR-PCR 反应体系优化为 25 μ L,其中 DNA 浓度为 10 ng/ μ L, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L,dNTPs 浓度为 0.5 mmol/L,*Taq* 酶浓度为 1.5 U,引物浓度为 0.4 mmol/L,1.6%的去离子甲酰胺。对 70 条 ISSR 引物(上海生工合成)进行初筛和复筛,从中选出能产生差异条带、重复性好的引物用于 ISSR-PCR 反应。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,50~60℃ 退火(退火温度随引物不同而定)70 s,72℃ 延伸 90 s,40 个循环;72℃ 延伸 7 min。

1.3 数据处理与统计分析

扩增产物经含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像系统观察并照相记录。统计引物对 38 份材料的扩增情况,将每个清晰可辨的 DNA 电泳带作为 1 个位点,当某个扩增物(带)在 1 个样品中出现,赋值为“1”,未出现视为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。

采用类平均聚类的方法(UPGMA)对供试材料进行系统聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

从 70 条引物中选取能产生差异条带、重复性好的引物 15 条进行分析(图 1 为引物 880 的扩增结果)。结果表明,15 条引物扩增出 117 条谱带,平均每条引物扩增出 7.8 条谱带,检测出的多态性谱带 98 条,占总谱带数的 83.7%(表 2)。

表 2 ISSR 分析所用引物

引物	序列	退火温度/℃	总带数	多态带	多态带/%
U809	(AG) ₈ G	60	7	7	100
U823	(TC) ₈ C	60	8	6	75
U825	(AG) ₈ T	60	6	5	83.3
U826	(AC) ₈ C	60	6	5	83.3
U844	(CT) ₈ RC	52	6	5	83.3
U856	(AC) ₈ YA	60	7	6	85.6
U857	(AC) ₈ Y	60	8	7	87.5
U873	(GACA) ₄	52	9	7	77.7
U880	(GGAGA) ₃	60	8	7	87.5
U881	(GGGTG) ₃	52	8	8	100
U885	BAB(GA) ₇	60	8	6	75
U886	VDV(CT) ₇	60	9	8	88.9
U888	DBD(CA) ₇	60	9	7	77.7
U889	DED(AC) ₇	60	9	8	88.9
U890	VHV(TG) ₇	60	10	7	70
Total	-	-	117	98	83.7

注:R=(A/G),Y=(C/T)。

2.2 遗传相似性分析

利用 15 条 ISSR 引物产生的 98 条 DNA 片段计算

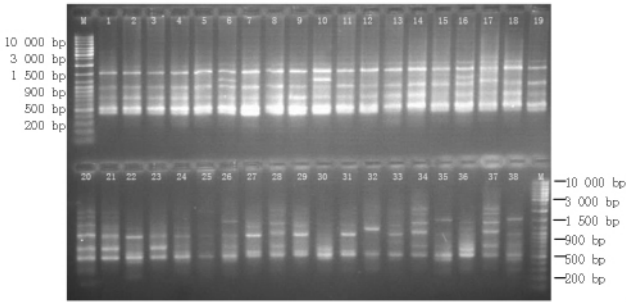
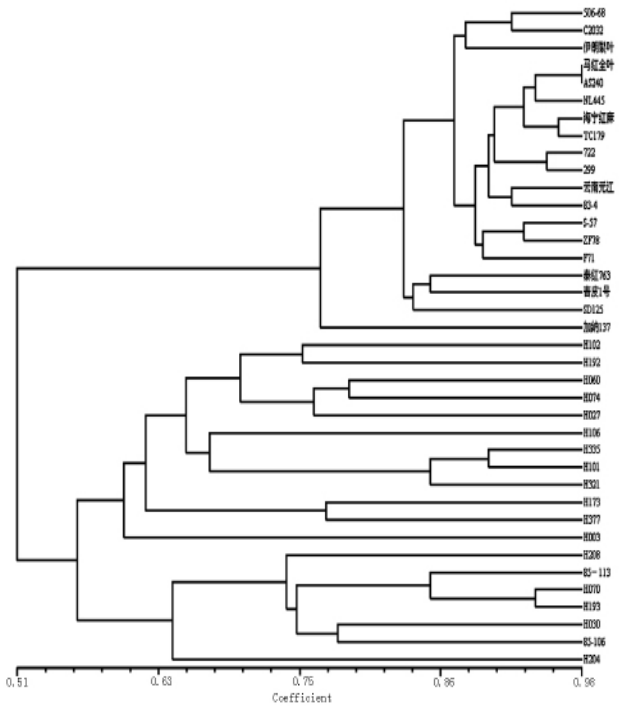


图 1 引物 U880 对红麻的扩增结果

供试材料间的遗传相似系数(GS)。38 份红麻种质间相似系数在 0.36~0.98 之间,表现出丰富的遗传多样性。其中,H003 与其它品种间相似系数在 0.36~0.63 之间,是与其它种遗传差异最大、遗传相似系数最低的红麻近缘种。栽培种马红全叶和 AS240 间遗传相似系数高达 0.98,亲缘关系最近。

2.3 聚类分析

经聚类分析构建亲缘关系树状图(图 2)。聚类分析表明,当 L1 取值为 D=0.56 时,可将 38 份材料分为三大类群,第 1 类群包括 19 份栽培种品种,品种间基因型差异较小,遗传基础相对狭窄;第 2 类群包括 6 份近缘种和 6 份野生种,近缘种 H335 和 H101 遗传相似系数高达 0.90,表明这 2 个品种基因型相似,亲缘关系较近,与



其它 10 个近缘种亲缘关系相对较远;第 3 类群包括 1 份野生种和 6 份近缘种。野生种 H030 与第 2 类群中的 6 份野生种间存在明显的遗传差异。

3 讨论

ISSR-PCR 扩增能够在未知物种基因组序列信息的条件下进行分析,检测基因组许多位点的差异,揭示遗传多样性。林荔辉^[8]用 13 条 ISSR 引物在 32 份红麻中扩增,共产生 59 条 DNA 条带,其中 47 条多态性带,平均多态性比率为 79.66%;该研究中,15 条引物在 38 份种质中共扩增出 117 个位点,其中多态性位点 98 条,平均多态性比率为 83.7%。以上研究表明,ISSR 分析能有效地检测红麻材料间的遗传变异,对红麻的遗传多样性分析是完全可行的。

筛选出的 15 条引物中,有 12 条二核苷酸重复序列引物,1 条四核苷酸重复序列引物,2 条五核苷酸重复序列引物。此结果表明,红麻染色体基因组中不仅二核苷酸重复序列较多,四、五核苷酸重复序列也相对较多。二核苷酸重复序列组成基本是 (AC)_n、(AG)_n、(CT)_n 等,研究中发现,基于 (AC)_n 重复序列 ISSR 引物明显比基于 (AG)_n 与 (CT)_n ISSR 引物能得到更多的片段,表明 (AC)_n 重复序列在红麻的基因组中分布频率和多态性较高,这表明在红麻中运用 ISSR 分子标记,根据引物出现情况、引物的涵盖面,可推断红麻重复序列种类和数量。

从聚类图上可知,来自同一地区的品种有的没有聚为一类,如近缘种 H192 与 H193 均来自尼泊尔,但归在不同的类群中;而来自不同地区的品种,有的可以聚为一类,如来自云南的云南元江与来自印度的 83-4。由此可以认为品种间的遗传距离与地理关系的远近没有必然的联系。这种现象可能是因为地区间的引种交流导

致了某些基因在不同地区之间的渗入,也可能是分子标记方法可反映基因组本质的差异所致^[9]。

从研究的结果来看,38 份红麻资源间相似系数在 0.36~0.98 之间,表现出丰富的遗传多样性。聚为第 1 类群的 19 个栽培品种,遗传相似性系数在 0.72~0.98 之间,品种间基因型差异较小。这主要是由于我国红麻品种多数由国外引进品种杂交育成,所用亲本来源差别不大,亲缘关系相对较近,因而国外引进品种与国内品种遗传基础相对狭窄。而红麻野生种和近缘种分布在第 2、3 类群中,与栽培种之间的遗传相似性系数相对较低,说明它们和栽培种间存在着较大的遗传差异,对育种材料遗传背景的拓展和种质的利用均有重要的地位和价值。

参考文献

- [1] 邓丽卿,栗建光,黄培坤.红麻种质资源的形态及分类研究[J].中国麻作,1991(4):16-20.
- [2] 邓丽卿.红麻和木槿属 *Furcaria* 组植物的形态分类及细胞遗传学研究[J].湖南农学院学报,1994,20(4):310-317.
- [3] Zietkiewicz E, Rajalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [4] 姜伟,朱宏波.不同来源棉花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].棉花学报,2008,20(5):348-353.
- [5] 黄光文,陈觉梁,王伟成,等.运用 ISSR 标记鉴别水稻品种的初步研究[J].杂交水稻,2006,21(3):64-67.
- [6] 杜金昆,姚颖垠.普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J].遗传学报,2002,29(5):445-452.
- [7] 白凤虎,谢晓美,李德芳,等.改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究[J].中国麻业科学,2007,29(3):158-161.
- [8] 林荔辉,汪斌,陶爱芬,等.用 ISSR 标记分析红麻种质资源的遗传多样性[J].武汉植物学研究,2008,26(3):240-244.
- [9] 王志峰,孙日飞,孙小镭,等.山东省黄瓜地方品种资源亲缘关系的 AFLP 分析[J].园艺学报,2004,31(1):103-105.

Genetic Diversity Analysis of Kanaf Germplasm by ISSR Markers

XIE Xiao-mei¹, WANG Zhi-wei¹, SU Jian-guang², BAI Feng-hu³

(1. Baoding Vocational College, Baoding, Hebei 071051; 2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205; 3. Bureau of Agriculture and Husbandry in Raoyang County, Hengshui, Hebei 053900)

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers were used to analyze the genetic relationship of 38 accessions of kenaf germplasm. Using 15 primers, we amplified 117 bands, of which 98 bands were polymorphic and the average percentage of polymorphic bands was 83.7%. The range of genetic similarity was 0.36~0.98, suggesting that the substantial genetic divergence between some varieties. The cluster analysis suggested that cultivated species had small differences of genotypes and their genetic basis was comparatively narrow, and there were higher genetic diversity within kenaf cultivated species, wild species and relatives.

Key words: kenaf; germplasm resource; ISSR; genetic diversity; relationship