

枸杞遗传多样性的 ISSR 分析

鲍红春¹, 李小雷², 王建平¹, 王建民¹

(1. 内蒙古农牧业科学院 园艺研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:为明确 10 个枸杞品种在 DNA 分子水平上的遗传差异, 利用 ISSR 分子标记技术对其多态性进行了分析。试验从 100 个 ISSR 引物中筛选出 8 个适宜引物, 8 个引物共扩增出 90 条清晰可辨的条带, 其中 44 条带具有多态性, 多态性条带百分率为 48.9%, 通过聚类分析, 以阈值 0.41 为基准, 把供试的 10 个材料划分为 2 个类群, 宁杞 5 号和张成枸杞的遗传距离为 0.629 6, 遗传关系最远。这将为枸杞的种质遗传多样性分析和杂交育种提供了初步理论依据。

关键词:枸杞; ISSR; 基因组 DNA; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S567 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0089-04

ISSR Analysis of Genetic Diversity of Chinese Wolfberry Germplasm

BAO Hong-chun¹, LI Xiao-lei², WANG Jian-ping¹, WANG Jian-min¹

(1. Institute of Horticulture, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Husbandry Sciences, Huhhot 010010, China; 2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: To know the genetic differences in DNA level among 10 Chinese wolfberry varieties, the polymorphism among the tested plants were analyzed based on ISSR molecular marker. From 100 ISSR molecular primers, eight were selected and used for genetic diversity analysis for the 10 Chinese wolfberry accessions. Ninety clear bands were amplified, in which 44 were polymorphic, accounting for 48.9%. At genetic distance 0.41, the 10 Chinese wolfberry accessions could be clustered into 2 groups. Ningqi 5 and Gouqi zhangcheng had the farthest genetic distance (0.629 6). The result provided the theoretical basis for Chinese wolfberry genetic diversity and hybridization breeding.

Key words: Chinese wolfberry; ISSR; Genomic DNA; Genetic diversity; Clustering analysis

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 植物, 是多年生落叶灌木, 俗称枸杞子, 其营养丰富, 既是名贵的中药材, 又是良好的滋补品。具有增强免疫力、抗衰老、抗氧化等多方面的药理作用^[1-2]。近年来随着对枸杞药用和营养保健品的开发利用, 对枸杞优良种苗的需求量在大幅度增加^[3], 枸杞品种选育也越来越受到育种者的重视。

枸杞为常异花授粉植物, 多为自交不亲和, 基因型高度杂合, 利用种子繁育的后代会发生明显的性状分离^[3-4]。长期以来人们为了保持枸杞品种的优良特性, 一直采用嫩枝扦插的营养繁殖方式繁育枸杞种苗。品种选育主要采用群体选优法, 利用自然变异选择突变单株, 通过无性扦插扩大繁殖。使得枸杞的品种间分类不明确, 遗传基础不清楚, 优良种质的特性难以通过品种间杂交被遗传利用^[5-8]。因

此, 对枸杞种质之间亲缘关系和遗传差异的研究是开展枸杞品种选育的前提条件。

ISSR (Inter simple sequence repeat) 分子标记是基于微卫星技术发展起来的一种新型分子标记技术, 具有多态性高、稳定性好、产物特异性强等特点, 目前被广泛应用于植物的品种鉴定、基因定位、遗传作图、分类与进化等诸多领域^[9]。本试验利用 ISSR 分子标记技术, 对 10 份枸杞种质材料进行了遗传多样性分析, 旨在为今后枸杞种质资源鉴定、保护和利用等研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为宁杞 1 号、宁杞 5 号、蒙杞 1 号、宁杞 0107、张成枸杞、扁果、品系 (0601、0602、0701、

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 内蒙古农牧业科学院青年创新基金项目 (2011QNJJN13)

作者简介: 鲍红春 (1979-), 女, 内蒙古赤峰人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事枸杞育种研究。

0702)。它们均来自内蒙古自治区农牧业科学院园艺研究所巴彦淖尔市先锋乡枸杞材料圃,分布范围较广,代表性较强。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与检测 春季剪取各供试材料的幼叶 0.2 g (各材料随机取 10 个叶片混合提取),利用植物基因组 DNA 试剂盒(天根公司产品)提取 DNA。取 5 μ L DNA 溶液用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行纯度检测,电泳缓冲液为 1 \times TAE Buffer,电泳 30 min 后,用凝胶成像系统仪照相。最后将各材料的 DNA 浓度稀释至 20 ng/ μ L 备用。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增反应体系 ISSR-PCR 扩增反应体系:1 \times Buffer,2 mmol/L Mg^{2+} ,0.2 mmol/L dNTPs,Taq DNA 聚合酶 1 U,引物 0.4 μ mol/L,模板 DNA 20 ng。扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,50 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 min,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后终止反应。

取 5 μ L 预扩增产物,在 1.5% 琼脂糖胶中进行电泳,电压为 50 V,电泳时间 1.5 h。凝胶用核酸染料进行染色,并照相。

1.2.3 引物筛选 以蒙杞 1 号和宁杞 1 号基因组 DNA 为模板,进行 ISSR 适宜引物筛选,试验所用的 100 个 ISSR 引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2.4 ISSR 标记的数据处理 记录胶板上清晰的条带,按照点样顺序逐条对多态性带进行比对,在有差异谱带的位置进行记录,有带记作 1,无带记作 0,生成 0,1 组成的数矩阵,根据类平均聚类方法 (UP-GMA),运用 SPSS 分析软件进行聚类。

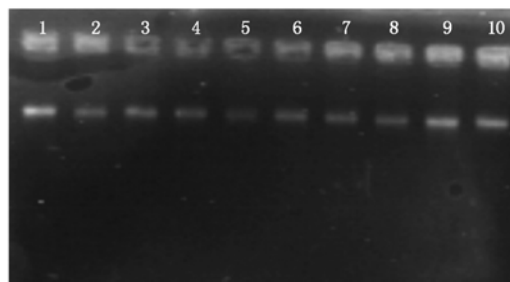
多态性条带百分率 (Percentage of polymorphic bands,简称 P): $P = (K/N) \times 100\%$,其中 K 为多态条带数目, N 为扩增出的条带总数。

供试材料的遗传相似系数 (GS) 和遗传距离 (GD):遗传相似系数 $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$,其中 N_{ij} 是指材料 i 和材料 j 共有的片段数目, $N_i + N_j$ 指在 2 个材料中出现的片段数目之和;遗传距离 $GD = 1 - GS$ 。

2 结果与分析

2.1 枸杞叶片基因组提取

由图 1 可知,10 个枸杞品种 (品系) 基因组 DNA 的电泳条带均匀、清晰,无拖尾现象,说明所提取的 DNA 纯度很高,完全能满足 ISSR 分析的要求。



1. 宁杞 1 号;2. 宁杞 0107;3. 宁杞 5 号;4. 蒙杞 1 号;5. 张成枸杞;6. 扁果;7. 0601;8. 0602;9. 0701;10. 0702。图 2 同。

1. Ningqi No. 1;2. Ningqi 0107;3. Ningqi No. 5;
4. Mengqi No. 1;5. Gouqi zhangcheng;6. Bianguo;
7. 0601;8. 0602;9. 0701;10. 0702. The same as Fig. 2.

图 1 10 个枸杞样品的总 DNA 电泳检测图谱

Fig. 1 Genomic DNA electrophoresis patterns of Wolfberry samples

2.2 ISSR 扩增结果

以宁杞 1 号和蒙杞 1 号的基因组 DNA 为模板,从 100 个引物中筛选出稳定性好、条带清晰、多态性丰富的适宜引物 8 个,用于品种间的 ISSR 比较分析 (表 1、图 2)。8 个引物共扩增出 90 条清晰可辨的条带,其 DNA 片段长度大多在 250 ~ 2 000 bp,平均每个引物扩增出 11.25 条,其中 44 条带具有多态性,多态性条带百分率为 48.9%,表明 10 份枸杞种质材料在 DNA 分子水平上存在着丰富的遗传多样性。

表 1 引物序列和扩增结果

Tab. 1 Primers sequences and amplified results

引物 Primers	序列 (5' - 3') Sequences	扩增带数/条 Amplified bands	多态性带数/条 Polymorphic bands	多态性带百分率/% Polymorphic percentage
A01	(CT) ₈ RG	10	9	90.0
A08	(CT) ₈ RC	8	3	37.5
A18	(AC) ₈ C	13	11	84.6
A39	(GA) ₈ RT	14	5	35.7
A51	(TC) ₈ A	11	2	18.2
A55	(ATG) ₆	7	3	42.9
A78	(AC) ₈ RG	15	8	53.3
A88	(GA) ₈ C	12	3	25.0
Total		90	44	48.9

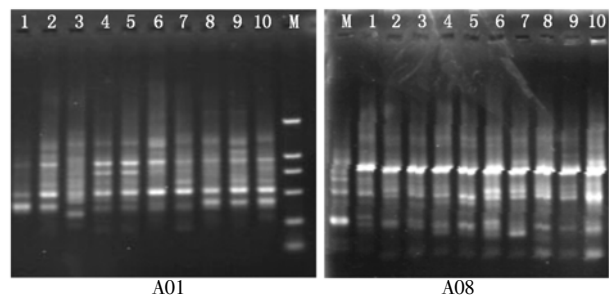
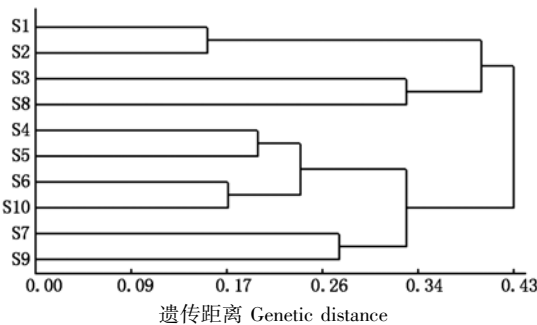


图 2 10 份枸杞种质材料分别以 A01 和 A08 为引物的 ISSR 扩增结果
Fig.2 ISSR amplified products of primer A01 and A08 of the 10 *Lycium barbarum* L.

表 2 供试材料的遗传距离矩阵

Tab.2 The genetics distance matrix of tested plants

项目 Item	宁杞 1 号 Ningqi No. 1	宁杞 0107 Ningqi 0107	宁杞 5 号 Ningqi No. 5	蒙杞 1 号 Mengqi No. 1	张成枸杞 Gouqi zhangcheng	扁果 Bian guo	0601	0602	0701
宁杞 0107 Ningqi No. 1	0.153 9								
宁杞 5 号 Ningqi No. 5	0.416 7	0.384 6							
蒙杞 1 号 Mengqi No. 1	0.481 5	0.379 3	0.407 4						
张成枸杞 Gouqi zhangcheng	0.418 5	0.379 3	0.629 6	0.200 0					
扁果 Bianguo	0.428 6	0.266 7	0.357 1	0.225 8	0.225 8				
0601	0.545 5	0.500 0	0.363 6	0.360 0	0.440 0	0.307 7			
0602	0.416 7	0.384 6	0.333 3	0.333 3	0.481 5	0.357 1	0.454 5		
0701	0.583 3	0.538 5	0.500 0	0.333 3	0.259 3	0.214 3	0.272 7	0.500 0	
0702	0.360 0	0.333 3	0.360 0	0.214 3	0.285 7	0.172 4	0.391 3	0.280 0	0.360 0



S1. 宁杞 1 号; S2. 宁杞 0107; S3. 宁杞 5 号; S4. 蒙杞 1 号;
S5. 张成枸杞; S6. 扁果; S7. 0601; S8. 0602; S9. 0701; S10. 0702。
S1. Ningqi No. 1; S2. Ningqi 0107; S3. Ningqi No. 5;
S4. Mengqi No. 1; S5. Gouqi zhangcheng; S6. Bianguo;
S7. 0601; S8. 0602; S9. 0701; S10. 0702.

图 3 10 份枸杞种质材料的 ISSR 聚类图

Fig.3 Dendrogram of the 10 *Lycium barbarum* L. based on the result of ISSR data

3 结论与讨论

ISSR 分子标记利用 15~24 个碱基的重复锚定引物扩增 SSR 之间的片段,具有操作简单、重复性好、稳定性高、多态性丰富等优点^[10-18]。ISSR 扩增反应受到模板 DNA 浓度与纯度、引物的浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq DNA 聚合酶等诸多因素影响,继而影响到扩增产物的稳定性。我们通过严格控制试验条件和

2.3 材料间亲缘关系聚类分析

由表 2 可知,10 份枸杞种质的遗传距离在 0.153 9~0.629 6,宁杞 1 号与宁杞 0107 间遗传距离最小,仅为 0.153 9,亲缘关系最近;宁杞 5 号与张成枸杞之间遗传距离最大,达到 0.629 6,亲缘关系最远。通过聚类分析,以阈值 0.41 为基准,把供试的 10 个材料明显地划分为 2 个类群,由图 3 所示,一类群含有宁杞 1 号、宁杞 0107、宁杞 5 号、0602;另一类群含有蒙杞 1 号、张成枸杞、扁果、0601、0701、0702。类群内枸杞亲缘关系较近,类群之间枸杞遗传关系较远,这将为枸杞杂交育种的亲本选配奠定基础。

对模板 DNA 用量、引物浓度等进行反复筛选,得到了清晰、稳定、重复性好的 ISSR 扩增条带。利用 8 个适宜引物对 10 个供试材料进行扩增,共扩增出 90 个位点,多态性位点百分率为 48.9%,表明供试材料间存在丰富的多态性。

品种(品系)间亲缘关系研究和遗传多样性分析对于植物育种具有重要的意义,全面地掌握现有种质资源的遗传多样性,可以减少育种工作中亲本选配的盲目性^[14]。本研究中 10 份供试材料间遗传距离 0.153 9~0.629 6。通过聚类分析,阈值 0.41 为基准,10 份供试材料聚为两类。第一类群为宁夏地区枸杞品种(品系),它们之间存在一定的遗传变异,遗传距离 0.153 9~0.416 7,亲缘关系较近,这与尚洁等^[7]的研究结果相似。第二类群为内蒙古地区枸杞品种(品系),他们之间的遗传距离 0.200 0~0.440 0,遗传相似性较高。10 份供试材料间存在一定的异质性,这为枸杞亲本选配、丰富种质资源和分子标记辅助选择育种提供良好的理论基础和科学依据。

参考文献:

[1] 马和平,李 毅,马彦军,等. 枸杞叶片再生植株体系

- 的建立[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 15-18.
- [2] 包振华, 郭军战, 周 玮, 等. 枸杞组织培养再生体系优化[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(5): 73-76.
- [3] 兰桃芳, 邢国明, 孟 璧. 枸杞愈伤组织诱导因子的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4907-4908.
- [4] 李彦龙, 樊云芳, 戴国礼, 等. 枸杞种质遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中草药, 2011, 42(4): 770-773.
- [5] 王亚军, 安 巍, 石志刚, 等. 枸杞药用价值研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 13213-13214.
- [6] 魏玉清, 许 兴. 不同地区主要栽培宁夏枸杞品种的 RAPD 分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(1): 91-95.
- [7] 尚 洁, 李 收, 张靠稳. 宁夏枸杞遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物研究, 2010, 30(1): 116-119.
- [8] 石志刚, 安 巍, 焦恩宁, 等. 基于 nrDNA ITS 序列的 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10379-10380.
- [9] 段丽君, 曹有龙, 周 军. 枸杞 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(12): 133-138, 145.
- [10] 许梦云, 吴治友, 赵玉国, 等. 道地药材茅苍术的 ISSR 分析[J]. 河南农业科学, 2009(7): 90-93.
- [11] 袁洪波, 艾尼江, 赵建军, 等. 棉花黄萎病菌致病力分化与 ISSR 遗传变异分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(5): 84-89.
- [12] 刘永财, 孟 林, 张国芳, 等. 新麦草种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 107-112.
- [13] 李进波, 江良荣, 李春海. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析比较[J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 42-47.
- [14] 赵春梅, 金荣荣, 刘 英. 甜瓜种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 27-28, 31.
- [15] 肖炳光, 杨本超. 利用 ISSR 标记分析烟草种质的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2153-2161.
- [16] 徐 菲, 宣继萍, 郑玉红, 等. 秋海棠属植物种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(3): 0471-0476.
- [17] Dong H F, Ren Y L. Analysis on chemical compositions in Chinese wolfberry from different producing areas[J]. Agricultural Science Technology, 2012, 13(9): 1870-1872.
- [18] Chen K T, Chang C H, Huang H, et al. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market[J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41: 11-14.