

文章编号: 1001-1498(2007)02-0278-05

油茶优良无性系 ISSR 分子鉴别

张国武^{1,2}, 钟文斌², 乌云塔娜³, 谭晓风³, 杜天真^{1*}

(1. 江西农业大学园林艺术学院, 江西 南昌 330045; 2. 中国林业科学研究院亚热带林业实验中心, 江西 分宜 336600;

3. 中南林业科技大学经济林栽培与育种国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要:采用 ISSR 分子标记, 以 1 个普通油茶实生苗作为对照, 对我国南方 10 个油茶优良无性系进行了遗传多样性分析。实验从 99 条引物中筛选出多态性较高的 16 条 ISSR 引物进行 PCR 扩增, 共扩增出 135 个位点, 其中多态性位点数为 114 个, 多态性位点比率为 84.44%。基因型间的平均遗传距离 (G_D) 为 0.419, 其中优良无性系与对照之间的 G_D 值相对较大, 平均为 0.58。聚类结果表明, 油茶优良无性系与普通油茶实生苗存在较大的遗传差异, 同时也较准确地进行了各优良无性系的分子鉴别, 为油茶的良种选育提供了理论依据。

关键词: ISSR; 分子标记; 油茶; 优良无性系

中图分类号: S794.4

文献标识码: A

Identification of Oil Tea (*Camellia oleifera*) Superior Clones by ISSR Molecular Marker

ZHANG Guo-wu^{1,2}, ZHONG Wen-bin², Wuyuntana³, TAN Xiao-feng³, DU Tian-zhen¹

(1. College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China; 2. Subtropical Experimental

Center of Forestry, CAF, Fengyi 336600, Jiangxi, China; 3. The Key Laboratory of Non-wood Forest Product of

State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: ISSR were used to detect the genetic diversity among 10 oil-tea camellia superior clones and 1 control sample (seedling). 16 primers out of 99 were screened out and 135 ISSR markers were amplified from these clones with 114 polymorphic loci. The average genetic distance between genotypes of clones was 0.419, which was of closer distance compared with that between superior clones and control sample, 0.58. The study showed that there was a big genetic distance between them and established the molecular identification of oil tea superior clones. It means that a sound ground was laid down for the molecular breeding of oil-tea.

Key words: ISSR; molecular marker; oil-tea camellia (*Camellia oleifera*); superior clones

茶油是世界上最优质的木本食用油。我国油茶 (*Camellia oleifera* Abel) 生产存在的突出问题是大面积低产且不稳定, 年平均产油不足 $45 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$, 主要原因是由于油茶长期处于野生、半野生状态, 自

然实生繁殖, 后代分离大, 且具异花授粉特性, 种内变异极其丰富, 林分中品种类型复杂。20 世纪 60 年代以来, 我国研究工作者在油茶良种选育等方面做了大量工作^[1-3]。90 年代以来, 这项工作取得了

收稿日期: 2006-06-20

基金项目: “高品质油茶有机栽培及基地建设关键技术研究”, 江西省科技厅重大招标项目 (20041A0500200), 教育部博士点基金项目 (20050410002)

作者简介: 张国武 (1966—), 男, 江西新余人, 高级工程师, 在读博士, 主要研究方向: 森林培育。E-mail: fzygwu@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 杜天真, 教授, 博士生导师。

重大突破,选育的品系年产油量达 $686.33 \sim 1\,046.9 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。新世纪以来,分子标记技术开始应用于油茶技术研究^[4-8]。其目的是建立油茶不同体系的分子鉴别体系,并从中筛选与主要经济性状相关的特殊基因片段,有利于辅助选择育种。

ISSR (Inter-simple Sequence Repeat Polymorphism) 分子标记与 RAPD 原理相似,不同处在于 ISSR 所用引物来源于简单序列区域,比随机扩增的多态 DNA (RAPD) 引物序列长,退火温度较高,具有稳定性优于、敏感性低于 RAPD 的特点。ISSR 操作简单,成本低,快速灵敏,检测多态能力强、所需 DNA 模板的量少^[9]而倍受青睐,已成功地运用于居群生物学的研究^[10,11]、品种鉴定^[12,13]、物种的分类

系统学比较^[14,15],并作为构建遗传图谱的工具^[16]。

本实验选用我国南方 10 个油茶优良无性系及 1 个普通油茶实生苗对照为材料,采用 ISSR 分子标记分析各材料之间的遗传差异,旨在探索各个基因型之间的亲缘关系,为开展油茶良种选育提供较可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试材料 供试材料(见表 1)中的 10 个无性系由中国林业科学研究院亚林中心长埠林场提供,实生苗来自湖南长沙普通油茶林。

表 1 用于 ISSR 分析的供试材料及被认定的相关经济性状

编号	名称	原产地	球果产量 / ($\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)	成熟期	种仁含油率 / %	球果数 / ($\text{个} \cdot \text{kg}^{-1}$)	干出籽率 / %
1	GLR 长油 3 号	江西进贤	12 039	早	35.73	69	31.3
2	GLR 长油 4 号	江西进贤	11 129	中	35.02	82	26.4
3	GLR 长油 18 号	浙江安吉	9 379	早	50.05	72	27.6
4	GLR 长油 21 号	浙江安吉	19 318	早	49.69	91	32.0
5	GLR 长油 27 号	浙江安吉	18 968	早	41.18	67	20.6
6	GLR 长油 40 号	浙江安吉	16 938	早	39.32	90	25.2
7	GLR 长油 53 号	浙江安吉	24 148	早	43.58	40	32.0
8	GLR 长油 56 号	浙江安吉	15 678	早	42.96	56	33.0
9	GLR 长油 59 号	湖南衡阳	18 758	早	39.96	60	25.7
10	实生苗对照 (CK)	湖南长沙	/	/	/	/	/
11	GLR 长油 166 号	江西进贤	13 887	早	51.40	84	24.0

1.1.2 ISSR 引物 ISSR 引物的名称和序列(见表 2),由上海英骏生物技术公司合成。

表 2 ISSR 引物名称及序列

引物名称	序列 (5' - 3')	引物名称	序列 (5' - 3')
812	GAGAGAGAGAGAGAA	851	GAGGTGATGTTGTYG
815	CCTCTCTCTCTCTCTG	852	TCTCTCTCTCTCTCTRA
821	GTTGTTGTTGTTGTTGTT	853	TCTCTCTCTCTCTCTRT
840	GAGAGAGAGAGAGAYT	854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG
841	GAGAGAGAGAGAGAYC	857	ACACACACACACACYG
843	CCTCTCTCTCTCTCTCTRA	860	TGTTGTTGTTGTTGTTGRA
844	CCTCTCTCTCTCTCTCTRC	899	CATGGTGTGGTCAATGTCCA
846	CACACACACACACART	900	ACTTCCCAACAGTTAACACA

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取主要采用中南林业科技大学经济林育种和栽培国家重点实验室改良的 CTAB 法^[17-19]。试验材料为 10 个油茶优良无性系及 1 个普通油茶实生苗对照苗木上取下的叶片。采样前先对待试验的叶片进行瓶闭,让其进行暗反应,消化叶片含糖量,提高基因组 DNA 的纯度。

1.2.2 DNA 纯度测定 DNA 纯度的测定采用核酸蛋白分析仪 (DU640)。测定的指标主要包括, $\text{abs}(260 \text{ nm})$ 、 $\text{abs}(280 \text{ nm})$ 。

1.2.3 ISSR 扩增

1.2.3.1 引物筛选 用 ISSR 引物对各供试材料进行 PCR 扩增,筛选出有稳定扩增条带且多态性较高的引物进行 PCR 扩增试验^[20]。

1.2.3.2 ISSR-PCR 反应体系 ISSR-PCR 反应总体积是 $10 \mu\text{L}$ 。包括 $0.8 \mu\text{L}$ 的 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, $0.8 \mu\text{L}$ 的 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, $1.0 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{PCR buffer}$, $0.4 \mu\text{L}$ 的引物 primer, $0.14 \mu\text{L}$ 的 $5 \text{ u} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA polymerase, 20 ng 的 DNA template, $6.26 \mu\text{L}$ 的 SDW (ddH_2O)。

1.2.3.3 ISSR-PCR 反应程序 94 预变性 5 min 后,PCR 扩增 38 个循环,每个循环 94 变性 45 s, 52 复性 45 s, 72 延伸 1.5 min,最后一个循环结束,然后在 72 延伸 7 min。最后 4 保存。

1.2.4 电泳

1.2.4.1 基因组 DNA 电泳 采用的是 $8.0 \text{ g} \cdot$

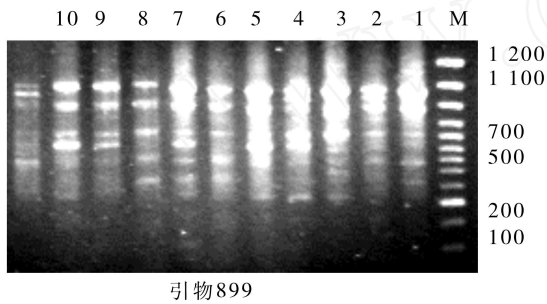
kg⁻¹的琼脂糖凝胶。

1.2.4.2 ISSR-PCR 产物的电泳 ISSR-PCR 产物电泳采用的是 20 g · kg⁻¹的琼脂糖凝胶。

1.2.5 数据分析 每个样品的扩增条带按有或无记录,扩增条带存在赋值 1,否则赋值 0。

1.2.6 ISSR 数据的统计分析方法 标准遗传距离 (Genetic Distance, GD)计算公式为: $GD = - \ln [2N_{ij} / (N_i + N_j)]$,其中 N_i 和 N_j 分别为 i 和 j 两个供试材料的条带数, N_{ij} 为 i 和 j 共有的条带数。GD 值越小,表示其亲缘关系越近。GD 值越大,表示其亲缘关系越远。

利用 POPgene32 软件进行各供试材料间 UPG-



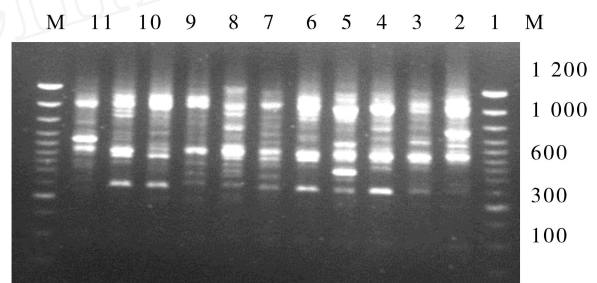
引物899

MA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean,算术平均加权配组法)聚类分析。

2 结果与分析

2.1 油茶无性系 ISSR 扩增结果

用 99 条引物对各材料进行了 PCR 扩增,选取 16 条稳定性强、重复性好、多态性丰富的引物。然后利用筛选出的 16 条引物对 11 个供试材料进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经电泳得到指纹图谱。结果表明:不同基因型之间具有不同的谱带类型。这说明不同供试材料在 DNA 水平上存在遗传差异。



引物900

图 1 不同引物 ISSR-PCR 电泳图 (编号 1~11 同表 1)

图 1 为引物 899 及引物 900 的 ISSR 谱带图,由图显示,引物 899 的 11 个材料 ISSR 谱带图共有 12 个多态性位点,引物 900 有 15 个多态性位点。说明这两条引物能够很好的区分 11 个供试材料,同时也说明了所选的材料之间存在明显的遗传差异。

2.2 DNA 的多态性分析

通过对 16 张图谱统计分析,共检测了基因组 DNA 中 135 个位点,其中多态性位点有 114 个,占扩增总位点数的 84.44% (见表 3)。每个引物扩增的带数一般在 3~12 条之间,平均为 6 条,检测结果 (见表 4)。

表 3 ISSR 引物特异性条带数

引物	扩增带数	多态性 DNA 条带数	%	引物	扩增带数	多态性 DNA 条带数	%
812	6	4	66.67	851	3	3	100
815	12	9	75	852	6	5	83.33
821	6	6	100	853	8	6	75
840	9	7	77.78	854	9	6	66.67
841	8	7	87.5	857	12	12	100
843	5	4	80	860	7	7	100
844	6	6	100	899	14	12	85.71
846	8	5	62.5	900	16	15	93.75
				(总计)	135	114	84.44

表 4 各引物对各材料的扩增带数

引物	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
812	5	3	5	5	6	4	5	3	3	4	2
815	8	8	9	12	9	6	6	9	9	8	10
821	5	2	6	1	6	2	5	2	1	0	1
840	6	5	9	4	3	6	3	4	6	4	3
841	6	2	3	8	3	2	3	3	2	3	2
843	5	5	4	4	5	4	5	4	5	4	6
844	2	4	5	6	5	4	5	5	4	5	3
846	7	8	7	7	8	5	6	5	7	7	5
851	2	2	1	1	3	2	3	1	3	2	2
852	3	2	3	3	4	6	3	3	4	3	5
853	6	6	4	6	5	7	8	6	6	4	5
854	9	5	6	7	8	4	7	6	7	8	6
857	6	8	9	10	12	7	10	10	8	0	9
860	5	7	4	0	5	5	3	4	4	3	4
899	12	8	12	9	14	9	8	6	7	8	9
900	15	10	11	9	10	8	16	8	12	10	9

由实验结果可以看出,扩增带数最多的为 900 号引物,平均 11 条扩增带;最少的为 851,平均 2 条扩增带。多态性最好的是 857 号引物,扩增出 12 个位点均具有多态性。在扩增出的 135 个位点的条带中,其中有 21 条为各个基因型所共有,这为 11 个材料间的同源性提供了依据。此外,不同引物扩增的

带数不同,而且同一引物不同基因型的扩增的带数也不一样,这充分体现了油茶基因组 DNA 的多态性,从而说明了不同供试材料之间的遗传差异性。

2.3 遗传差异

为了确定油茶各供试材料基因之间的遗传关系,利用每个材料的扩增条带按有或无记录,扩增条带存在赋值 1,否则赋值 0 的数据分析方法,建立了 11 个材料的 ISSR 识别卡 (见表 5)。

表 5 11 个材料 ISSR 鉴定识别卡 (引物 899)

编号	ISSR 鉴定标记												识别号
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	001000001000
2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	010001000000
3	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	111100100011
4	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	011000101001
5	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	001010100101
6	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	000100011000
7	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	101110110100
8	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	100101011100
9	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	101110110000
10	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	000011110000
11	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	011010011001

由各材料基因型间的遗传距离 (表 6) 可知,油茶基因型间的平均遗传距离 (GD) 为 0.419,基因型之间 GD 值范围为 0.167 1~0.773 2,其中优良无性系与实生苗的遗传距离 GD 相对较大,平均为 0.58,说明这二者存在明显差异。而无性系 3 号和 18 号,27 号和 56 号,21 号和 40 号之间的 GD 值较小,说明他们之间的亲缘关系较近。

2.4 聚类分析

为了确定各供试材料之间的遗传关系,通过

表 6 ISSR 标记的 11 个材料的遗传距离及相似性

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	* * * *	0.692 3	0.923 1	0.769 2	0.769 2	0.769 2	0.846 2	0.923 1	0.769 2	0.538 5	0.769 2
2	0.367 7	* * * *	0.615 4	0.461 5	0.769 2	0.615 4	0.692 3	0.769 2	0.615 4	0.538 5	0.615 4
3	0.080 0	0.485 5	* * * *	0.846 2	0.846 2	0.846 2	0.923 1	0.846 2	0.846 2	0.615 4	0.846 2
4	0.262 4	0.773 2	0.167 1	* * * *	0.692 3	0.846 2	0.769 2	0.692 3	0.846 2	0.769 2	0.846 2
5	0.262 4	0.262 4	0.167 1	0.367 7	* * * *	0.846 2	0.769 2	0.846 2	0.846 2	0.615 4	0.846 2
6	0.262 4	0.485 5	0.167 1	0.167 1	0.167 1	* * * *	0.769 2	0.692 3	0.846 2	0.769 2	0.846 2
7	0.167 1	0.367 7	0.080 0	0.262 4	0.262 4	0.262 4	* * * *	0.769 2	0.769 2	0.538 5	0.769 2
8	0.080 0	0.262 4	0.167 1	0.367 7	0.167 1	0.367 7	0.262 4	* * * *	0.846 2	0.461 5	0.692 3
9	0.262 4	0.485 5	0.167 1	0.167 1	0.167 1	0.167 1	0.262 4	0.167 1	* * * *	0.615 4	0.692 3
10	0.619 0	0.619 0	0.485 5	0.262 4	0.485 5	0.262 4	0.619 0	0.773 2	0.485 5	* * * *	0.769 2
11	0.262 4	0.485 5	0.167 1	0.167 1	0.167 1	0.167 1	0.262 4	0.367 7	0.367 7	0.262 4	* * * *

ISSR 遗传距离矩阵按 UPGMA 进行了聚类分析,构建各材料基因型之间的亲缘关系 (见图 2)。

聚类分析中,把材料基因型间的遗传距离作为材料聚为一类的依据。由聚类图可以看出,取 GD = 0.65 时,可将 11 个供试材料划分为 3 大集群。类群 为油茶实生苗对照,与所有无性系划分在不同的类群中,这和实生苗与无性系苗在形态、生理等特征方面的较大差异性相吻合,如实生苗苗木分化严重,无性系苗普遍成熟期早等;类群 为 GLR 长油 4 号一个无性系,这可能与表 1 记录的该无性系相对其它无性系果实成熟晚、种仁含油率低的特征相一致,4 号无性系果实成熟期为“中”,种仁含油率仅 35.02%,其它 9 个无性系成熟期均为“早”,种仁含油率除了 3 号无性系较 4 号略高外,其它平均为 44.76%,高出了近 12 个百分点;类群 为其它 9 个无性系,这可能与它们普遍成熟相对较早、种仁含油率相对较高相关。同时,聚类分析也显示出各优良无性系间存在一定的差异,可以从分子水平上将它们进行鉴别。

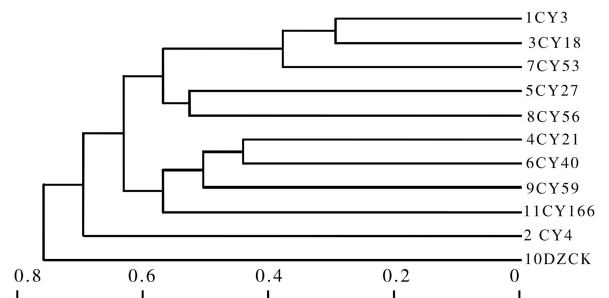


图 2 油茶优良无性系及对照聚类分析图 (CY 代表 GLR 长油; DZ 代表普通油茶实生苗对照)

3 小结

(1)利用 ISSR 分子标记的方法,从 99 条引物中筛选出 16 条具有多态性的引物进行扩增,得到 135 个位点,其中 114 个具有多态性,说明油茶各供试材料间存在较大的遗传差异。

(2)利用 16 条引物对供试材料进行 ISSR 分析表明,油茶优良无性系与普通油茶实生苗之间,长油 4 号无性系与其它 9 个无性系之间的遗传距离大,与其在生理、性状表现上的差异性分析基本一致,说明了遗传本质差异对外部表型特征的对应反映。同时 ISSR 分析实现了对各供试材料的分子鉴别,较准确地确立了它们之间的亲缘关系。对彼此间亲缘关系较近的无性系,如长油 27 号与长油 56 号具有第一分枝较高的共性,长油 166 号为小果红色,类似差异性和相似性的表型特征有待在实践中作进一步研究探讨。

(3)ISSR 分子标记可建立油茶优良无性系的分子鉴别体系,进行油茶更多品种的分类鉴定和遗传关系研究,并为油茶的选择育种提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张日清,李建安,刘友全,等. DH 育种技术及其在油茶品种改良中的研究现状 [J]. 经济林研究, 2004, 22(4): 71~75
- [2] 何汉杏,康文星,何秀春. 普通油茶及其优树生殖生态研究 [J]. 经济林研究, 2002, 20(4): 10~13
- [3] 韩宁林. 油茶栽培丰产技术研究进展 [J]. 林业科技开发, 2000, 14(1): 10~13
- [4] 黄永芳,陈锡林,雷治国,等. 油茶种质资源 RAPD 分析 DNA 提取和 PCR 扩增条件建立 [J]. 河南农业科学, 2004(12): 22~25
- [5] 张自俊. 油茶优良无性系组织培养, RAPD 分子鉴别和 cDNA 文库构建的研究 [D]. 长沙:中南林学院, 2002
- [6] 陈永忠,王湘南. 油茶生物技术育种研究前景展望 [J]. 湖南林业科技, 2005, 32(4): 5~7
- [7] 陈永忠,张智俊,谭晓风. 油茶优良无性系的 RAPD 分子鉴别 [J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 40~45
- [8] 胡芳名. 油茶种子表达的主要储藏蛋白基因及其分析 [J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 24~26
- [9] 余艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件的优化与筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15~19
- [10] Li Ge S. Genetic variation and clonal diversity of *Pammochla villorisa* (Poaceae) detected by ISSR markers [J]. Ann Bot, 2001, 87: 585~590
- [11] Esselman E J, Li J Q, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Colanmogrotis ported* sp. In speram (BDA eae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Mol Ecol, 1999, 8: 443~451
- [12] Ammiraju J S S, Dholakin B B, Santra D K, et al. Identification of intersimple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 726~732
- [13] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kcphan S R. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5 112~5 115
- [14] Hao G, Lee D H, Lee J S, et al. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect *Sacculiferum* and related species using intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Bot Buu Aced Sin, 2002, 43: 63~68
- [15] Iruela M, Rubio J, Cubero J I, et al. Phylogenetic analysis using genic and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 643~651
- [16] Arcade F A, Anselin P, Rampant F, et al. Application of AFLP, RAPD, and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 299~307
- [17] 谭晓风,漆龙霖,黄晓光,等. 山茶属植物叶片 DNA 抽提 [J]. 中南林学院学报, 1999, 19(4): 75~79
- [18] 乌云塔娜,张党权,谭晓风. 梨不同 DNA 提取方法的效果研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 98~101
- [19] 姜静. 分子生物学实验原理与技术 [M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2003
- [20] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册 [M]. 北京:高等教育出版社, 1998: 3~12