

基于 ISSR 标记的 44 份桃种质资源遗传多样性分析^①

罗 慧¹, 丁广文¹, 郭启高¹, 向素琼¹,
孙海艳¹, 梁国鲁¹, 王 进², 武 峥², 何 桥¹

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 重庆市农业科学院果树研究所, 重庆 江津 401329

摘要: 从 100 条 ISSR 引物中筛选出 16 条多态性高、重复性好的引物, 对 44 份桃栽培品种进行遗传多样性分析, 共扩增出 141 条带, 其中 120 条带具有多态性, 百分率高达 85.1%, 每条引物扩增条带在 4 条到 13 条不等, 平均 8.8 条. 44 份材料的相似性系数在 0.404~0.979 之间, 表明供试的 44 份桃品种间有较丰富的遗传多样性. 通过 UPGMA 聚类分析将桃资源材料分为 5 个亚组.

关 键 词: 桃; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)05-0045-06

桃(*Prunus persica* L. Batseh)是蔷薇科(Rasaceae)桃属的一种落叶小乔木, 原产于中国, 多数果实可食用, 花可观赏. 桃种质资源丰富, 世界上约有 3 000 个不同品种和类型, 我国大约有 2 000 多个品种. 重庆市农业科学院果树研究所近年从国内外引进和收集了 44 份主栽品种, 由于引进品种尚未结果, 且大部分品种的植株和叶片性状差异不明显, 难以对所搜集资源的遗传多样性进行准确评价, 而基因组 DNA 分子标记具有非常明显的优势. ISSR(inter-simple sequence repeat)是一种基于微卫星序列发展起来的十分有效的分子标记, 以 PCR 扩增为基础, 可以检测基因组中多个位点的差异^[1]. 该技术具有多态性高、操作简便、稳定性好、成本较低的优点, 已广泛应用与植物品种鉴定、遗传多样性与亲缘关系分析、分子遗传图谱构建等多个方面^[2-3].

目前, 关于桃分子标记方面的工作主要集中在遗传多样性分析与亲缘关系分析上^[4-5]. HU 等人^[6]对观赏桃遗传关系进行了 ISSR 指纹分析, 充分揭示了 ISSR 标记在桃种质分析中的重要性与高效性. 因此, 本研究利用 ISSR 分子标记技术对供试的 44 份桃种质资源进行遗传多样性分析, 旨在为这些种质资源的利用和核心种质的保存提供重要的参考依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来源于重庆市农业科学院果树研究所设立在永川黄瓜山的桃种质资源圃, 共 44 份(表 1).

① 收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 重庆市科技攻关项目(CSTC2008AB1077).

作者简介: 罗 慧(1989-), 女, 四川眉山人, 硕士研究生, 主要从事现代果树遗传育种研究.

通信作者: 何 桥, 副研究员.

表 1 桃资源供试材料

编号	品 种	来 源	果肉颜色	成熟期	粘/离核	原产地
1	燕红	实生选育	白色	晚熟	粘核	郑州
2	简阳晚白桃	水蜜桃变异	白色	晚熟	粘核	四川
3	新川中岛	川中岛实生选育	黄白色	早熟	半粘核	日本
4	瑞山红					郑州
5	瑞光 2 号	京玉×NJN76		早熟	粘核	北京
6	安农水蜜	砂子早生株变	乳白色	早熟	半粘核	安徽
7	渝油 1 号			早熟		重庆
8	早霞露					浙江
9	大观 1 号					浙江
10	本地品种					重庆
11	中油 5 号		白色	早熟	粘核	郑州
12	中油 4 号		橙黄色	早熟	粘核	郑州
13	丽春		乳白色	早熟	半粘核	北京
14	超红	whitelady 实生选育	绿白色	晚熟		北京
15	春雪		白色	早熟	粘核	上海
16	北京 27 号		黄白色	早熟		北京
17	晶玉					不详
18	红清水					日本
19	丹墨	(京玉×NJ76)×早红 2 号	黄色	早熟	粘核	北京
20	艳光	25-10 × Armkin	白色	早熟	粘核	郑州
21	皮球桃		白色	早熟	离核	四川
22	早红珠	京玉×A369	白色	早熟	粘核	北京
23	早凤玉			中熟		北京
24	砂子早生	自然实生	乳白色	早熟	半离核	日本
25	大久保	自然实生	乳白色	早熟	离核	日本
26	曙光		黄色	早熟	粘核	郑州
27	津优	京玉×重庆地方品种	白色	早熟	半粘核	重庆
28	京艳			晚熟		北京
29	垂枝桃					郑州
30	千年红		黄色	早熟	粘核	郑州
31	京春	实生选育	白色	早熟	粘核	北京
32	瑞光 19 号		白色	中熟	半离核	北京
33	双喜红		黄色	早熟	离核	郑州
34	美玉					郑州
35	渝油 2 号					重庆
36	南参贡桃					不详
37	香桃					重庆
38	莱山蜜		乳白色	中熟	粘核	山东
39	南方早红		白色	早熟		郑州
40	大重花瓣					郑州
41	中华寿桃			晚熟		山东
42	红叶桃					郑州

注：本地品种包括早红宝石、24-1、金世纪 3 个品种。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与 ISSR-PCR 扩增

桃基因组 DNA 的提取参照 ROCHE 等人^[7]改良的 CTAB 法. PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 上进行, 所用程序为: 94 ℃ 4 min, 1 个循环; 94 ℃ 45 s, 50~55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 10 ℃ 保存. 扩增产物用含有 0.2% GoldView TM 核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司)的 1.5% 琼脂糖 (Invitrogen)凝胶电泳分离, 在凝胶成像系统上采集图像, 用 Quantity One 4.3.1 软件进行分析.

1.2.2 ISSR 体系的正交优化

参照各组分常用浓度^[8-9], 选用 L25(56). 正交设计见表 2, 选择用引物 810; DNA 模板随机从材料中选择一个, 每个处理 10×Buffer 用量均为 2 μL, 用灭菌超纯水补足至总体积为 20 μL.

1.2.3 数据处理与分析

电泳结果采取 0/1 赋值记带, 强反应带记“1”, 弱反应带重复出现记“1”, 弱反应带出现但不重复记“0”, 无带记“0”. 数据采用 NTSYSpc-2.10e 软件处理, 相似性系数采用 Dice 系数, UPGMA 聚类分析.

2 结果与分析

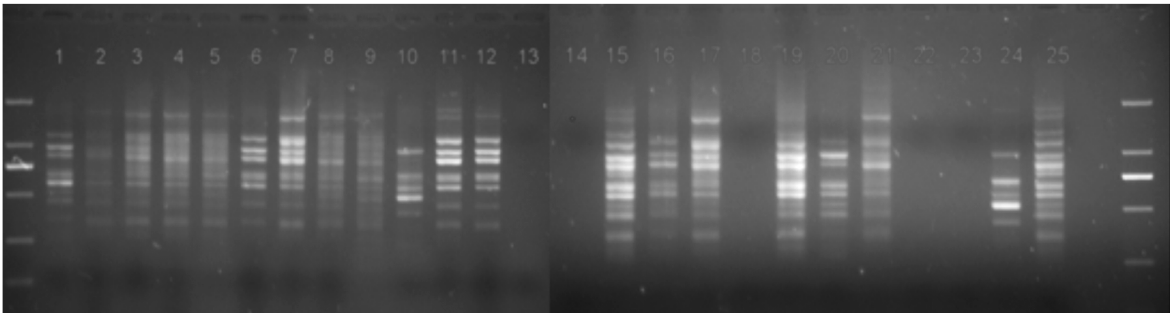
2.1 ISSR-PCR 反应体系优化

正交试验 25 个组合未能都扩出条带, 组合 11 扩增效果最好(图 1). 将 25 个处理依次打分, 条带数量多、清晰且稳定的最佳产物记 25 分, 最差的记 1 分^[10-11]. 根据打分结果(表 2)进行直观分析, 正交设计所涉及的 5 个因素对 ISSR 反应体系的影响从大到小为: 引物浓度, MgCl₂, DNA 模板, dNTP, Taq 酶. 根据得分数据平均值 k_i 初步确定个因素最适用量分别为: dNTP 0.6 μL, 引物 1.2 μL, MgCl₂ 1.5 μL, Taq 酶 0.2 μL, 模板 DNA 1 μL.

表 2 体系优化正交设计表

编号	体 积/μL					得分
	dNTP (10 mmol/L)	引物	MgCl ₂ (25 mmol/L)	Taq 酶 (50 U/μL)	DNA 模板	
1	0.2(1)	0.5(1)	0.5(1)	0.10(1)	1(1)	16
2	0.2(1)	0.7(2)	1.0(2)	0.15(2)	2(2)	3
3	0.2(1)	0.8(3)	1.5(3)	0.20(3)	3(3)	9
4	0.2(1)	1.0(4)	2.0(4)	0.25(4)	4(4)	8
5	0.2(1)	1.2(5)	2.5(5)	0.30(5)	5(5)	7
6	0.4(2)	0.5(1)	1.0(2)	0.20(3)	4(4)	18
7	0.4(2)	0.7(2)	1.5(3)	0.25(4)	5(5)	20
8	0.4(2)	0.8(3)	2.0(4)	0.30(5)	1(1)	6
9	0.4(2)	1.0(4)	2.5(5)	0.10(1)	2(2)	5
10	0.4(2)	1.2(5)	0.5(1)	0.15(2)	3(3)	14
11	0.6(3)	0.5(1)	1.5(3)	0.30(5)	2(2)	25
12	0.6(3)	0.7(2)	2.0(4)	0.10(1)	3(3)	24
13	0.6(3)	0.8(3)	2.5(5)	0.15(2)	4(4)	1
14	0.6(3)	1.0(4)	0.5(1)	0.20(3)	5(5)	1
15	0.6(3)	1.2(5)	1.0(2)	0.25(4)	1(1)	23
16	0.8(4)	0.5(1)	2.0(4)	0.15(2)	5(5)	16
17	0.8(4)	0.7(2)	2.5(5)	0.20(3)	1(1)	19
18	0.8(4)	0.8(3)	0.5(1)	0.25(4)	2(2)	1
19	0.8(4)	1.0(4)	1.0(2)	0.30(5)	3(3)	21
20	0.8(4)	1.2(5)	1.5(3)	0.10(1)	4(4)	17
21	1.0(5)	0.5(1)	2.5(5)	0.25(4)	3(3)	10
22	1.0(5)	0.7(2)	0.5(1)	0.30(5)	4(4)	1
23	1.0(5)	0.8(3)	1.0(2)	0.10(1)	5(5)	1
24	1.0(5)	1.0(4)	1.5(3)	0.15(2)	1(1)	15
25	1.0(5)	1.2(5)	2.0(4)	0.2(3)	2(2)	22
k_1	8.6	17.0	6.6	12.60	15.8	
k_2	12.6	13.4	13.2	9.80	11.2	
k_3	14.8	3.6	17.2	13.80	15.6	
k_4	14.8	10.0	15.2	12.40	9	
k_5	9.8	16.6	6.4	12	7	
R	6.2	13.4	10.8	4	8.8	

注: 表中括号内数字表示不同浓度梯度, k_i 为平均值, R 为极差.



图中 1—25 与表 2 一致.

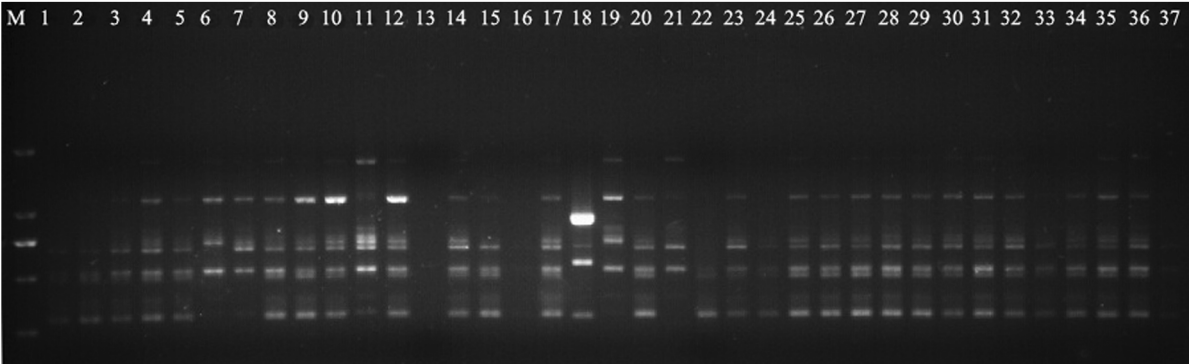
图 1 用引物 810 进行的桃品种体系优化的 ISSR 图谱

2.2 多态性分析

利用优化的反应体系从 100 条 ISSR 引物中选出 16 条条带清晰、稳定性好、多态性高的引物对 44 份桃资源进行扩增, 16 条引物共扩增出 141 条带, 其中 120 条带具有多态性, 其多态性百分率为 85.1%(表 3). 各引物扩增条带数在 4 条到 13 条不等, 平均为 8.8 条. 图 2 为引物 843 对部分桃资源品种的 PCR 扩增产物的电泳图谱.

表 3 桃 ISSR 扩增结果统计表

引物	序 列	扩增 条带数	多态性 带数	多态位点 百分率/%	引物	序 列	扩增 条带数	多态性 带数	多态位点 百分率/%
809	(AG) ₈ G	12	9	75	864	(ATG) ₆	13	10	76.9
810	(GA) ₈ T	9	5	55.6	865	(CCG) ₆	4	1	25
811	(GA) ₈ C	13	10	76.9	880	(GGAGA) ₃	10	10	100
817	(CA) ₈ A	7	7	100	881	(GGGTG) ₃	8	8	100
843	(CT) ₈ RA	9	9	100	889	DBD(AC) ₇	8	7	87.5
847	(CA) ₈ RC	6	5	83.3	890	VHV(GT) ₇	8	8	100
848	(CA) ₈ RG	4	3	75	891	HVH(TG) ₇	8	6	75
851	(GT) ₈ YG	10	10	100	合计		141	120	—
856	(AC) ₈ YA	12	12	100	平均		8.8	7.5	85.1



1—37 点样顺序按照表 1 所示顺序; M: maker.

图 2 引物 843 在 44 份桃材料中的 ISSR 图谱

2.3 遗传相似性聚类分析

从图 3 可以看出, 红叶桃与其他桃品种间的亲缘关系远. 以相似性系数 0.425 为阈值, 可将 44 份桃资源划分为 2 个大类, 红叶桃单独为 1 组, 除红叶桃外的其余 43 份资源为另一组. 另一组中, 以相似性系数 0.85 为阈值, 可将其划分成 5 个亚组, 所有供试材料中, 丹墨和艳光的相似性系数最高, 达到 0.97, 亲缘关系最近.

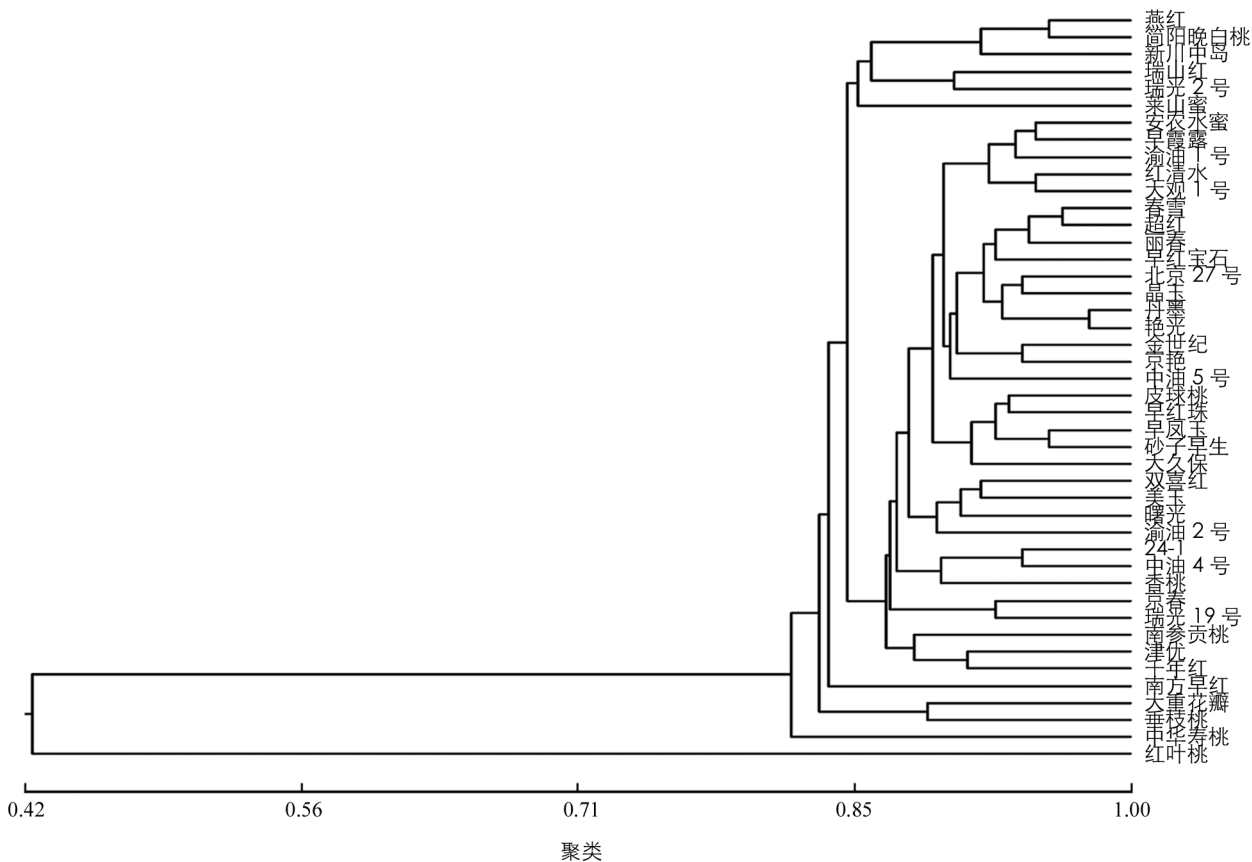


图 3 44 份桃资源材料基于 ISSR 分析的 UPGMA 聚类图

3 讨 论

桃种质资源丰富, 并且具有广泛的多样性, 本研究通过利用 100 条引物对 44 份国内外桃样本材料做 ISSR 分析, 筛选出 16 条引物, 几乎每条引物都能扩出一个或几个供试材料的特殊带. 聚类结果结合所用材料的生物学特征可知早熟品种与晚熟品种两种类型的聚类结果相互交叉, 与史丽红等人^[12]的研究结果一致. 对统计结果聚类分析可知, 红叶桃与其他食用桃品种间的亲缘关系最远, 单独为一组, 这是因为红叶桃是较为原始的品种; 其余 43 份食用桃相似系数在 0.82 左右, 亲缘关系十分接近, 这是因为食用桃品种常在类群间进行人为杂交, 用于选择系品种, 这与前人的研究结果^[13-16]一致. 红叶桃属于蔷薇科, 是观赏桃的一种, 是碧桃的一个变异的品种, 原产于我国的中原和华北, 因其比较容易栽培, 所以在园林上的应用比较广泛. 桃原产于中国, 最远可以追溯到周朝, 逐渐传播到亚洲周边地区, 后传入日本. 本研究中来自日本的桃品种新川中岛、红清水、砂子早生、大久保, 经聚类分析可知, 与所选国内品种亲缘关系十分接近. 供试材料中丹墨和艳光亲缘关系最近. 丹墨的品种来源是由北京市农林科学院植保环保研究所等单位在 1989 年以(京玉×NJ76)×早红 2 号育成, 而艳光是 1992 年在临朐县五井镇青石崖村果园发现的肥城桃的自然优良实生单株, 嫁接扩繁. 前人并没有两种桃的亲缘关系的鉴定. 经分析可知, 两个品种的亲缘关系十分接近. 安农水蜜是安徽农业大学园艺系于 1986 年在砂子早生中发现的自然株变选育而成, 它与砂子早生的相似性系数是 0.894, 说明在不断的栽培和不断的变异之后, 安农水蜜和砂子早生的亲缘关系已经逐渐变远了, 这可能是由分子标记能反应基因组本质差异所导致, 也可能是因为在自然过程中发生了外源基因片段的渗入.

参考文献:

[1] 张青林, 罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 2004, 21(1): 54—58.
[2] 田大翠, 朱宏波, 郭建夫, 等. 马铃薯遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国马铃薯, 2010, 24(1): 1—5.

- [3] 陈 业, 石建明, 沈文华, 等. 23 种中国兜兰属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(6): 15—21.
- [4] WÜNSCH A, CARRERA M, HORMAZA J I. Molecular Characterization of Local Spanish Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] Germplasm [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53(5): 925—932.
- [5] XU D H, WAHYUNI S, YAMAGUCHI M. Genetic Diversity and Relationships of Japanese Peach (*Prunus persica* L.) Cultivars Revealed by AFLP and Pedigree Tracing [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 883—889.
- [6] HU D, ZHANG Z, ZHANG Q, et al. Ornamental Peach and Its Genetic Relationships Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Fingerprints [C]. VI International Peach Symposium 713, 2005: 113—120.
- [7] ROCHE P, ALSTON F H, MALIEPAARD C, et al. RFLP and RAPD Markers Linked to the Rosy Leaf Curling Aphid [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 528—533.
- [8] 陈元生, 彭建宗. 葛属植物 ISSR-PCR 扩增条件的正交优化 [J]. 广东农业科学, 2010, 37(1): 120—123.
- [9] 林 玲, 汤浩茹, 刘 燕, 等. 观赏桃 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 生物技术通报, 2009(12): 72—75.
- [10] 曾艳玲, 谭晓风, 曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 湖北农业科学, 2008, 47(11): 1235—1238.
- [11] 桂腾琴, 孙 敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系 [J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108—112.
- [12] 史红丽, 韩明玉, 赵彩平. 桃遗传多样性的 SRAP 和 SSR 标记分析 [J]. 华北农学报, 2009, 24(6): 187—192.
- [13] 程中平, 陈志伟, 胡春根. 利用 RAPD 标记对桃不同类群的遗传差异比较 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2003, 49(2): 266—270.
- [14] 王富荣, 赵剑波, 佟兆国, 等. 桃种质资源亲缘关系的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(1): 118—122.
- [15] 程中平. 桃亚属植物系统发育及桃遗传多样性的分子生物学研究 [D]. 武汉: 中国科学院武汉植物园, 2007.
- [16] 方伟超, 王力荣, 朱更瑞. 桃 (*Prunus persica*) 品种资源结果习性遗传多样性与评价指标探讨(I) [J]. 果树学报, 2008, 25(6): 801—805.

Study of Genetic Diversity of 44 *Prunus persica* Accessions Based on ISSR Markers

LUO Hui¹, DING Guang-wen¹, GUO Qi-gao¹,
XIANG Su-qiong¹, SUN Hai-yan¹, LIANG Guo-lu¹,
WANG Jin², WU Zheng², HE Qiao¹

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Jiangjin Chongqing 401329, China

Abstract: In a study based on inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers, 16 primers were screened from 100 ISSR primers to analyze the genetic diversity of 44 *Prunus persica* accessions/cultivars. A total of 141 DNA fragments were amplified, of which 120 were polymorphic, accounting for 85.1% of the total. The number of DNA fragments amplified per primer ranged from 4 to 13, averaging 8.8. The coefficient of genetic similarity of the 44 *P. persica* cultivars ranged from 0.404 to 0.979, showing that there was rich genetic diversity among the cultivars. Based on UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) analysis, the cultivars studied were clustered into five sub-groups.

Key words: *Prunus persica*; ISSR; genetic diversity

