

马铃薯遗传多样性的 ISSR 分析

田大翠, 朱宏波*, 郭建夫, 黄建堂

(广东海洋大学农学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 利用 ISSR 分子标记分析了 20 个马铃薯材料的遗传多样性和亲缘关系。从 60 条 ISSR 引物中筛选出 10 个 ISSR 引物, 在供试材料中共扩增出 57 个清晰条带, 其中 48 个具有多态性, 多态性比率为 84.21%, 各扩增条带的多态性信息指数(PIC)平均为 0.2055。种质间遗传相似系数变化范围为 0.5263-0.9825, 平均值为 0.7220。通过聚类分析 20 份马铃薯材料分为五大类, 富金单独是一类, 第二类有 2 个品种, 即克新 17 号和黑美人, 大西洋和 YN-1 为第三大类, 克新 20 号和中薯 1 号为第四类, 其余归到第五大类。试验结果显示, 所选马铃薯材料的遗传差异比较大, 遗传多样性相对丰富。本研究的结果为马铃薯杂交育种的亲本选配提供了理论依据。

关键词: 马铃薯; ISSR; 遗传多样性

Genetic Diversity Analysis Based on Potato ISSR

TIAN Dacui, ZHU Hongbo, GUO Jianfu, HUANG Jiantang

(Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were employed to analyze the genetic diversity of 20 potato (*Solanum tuberosum*) varieties. Fifty-seven DNA fragments were amplified by using 10 primers screened from 60 ISSR primers, of which 48 DNA bands were polymorphic, and the polymorphism ratio was 84.21%. The average polymorphism information content (PIC) was 0.2055. The genetic similarity among different varieties ranged from 0.5263 to 0.9825, with an average of 0.7220. The cluster analysis based on ISSR markers revealed that the variety Fujin was clustered into the first group separately from all the others. The second group had two varieties, which named Kexin 17 and Black Beauty. The third group contained Atlantic and YN-1. Kexin 20 and Zhongshu 1 were in the next group. The other varieties were clustered into one big group. The results showed that the genetic diversity of the tested potato varieties vary widely, which provided the theoretic basis for choosing parents in potato breeding program.

Key Words: potato; ISSR; genetic diversity

马铃薯是世界第 4 大粮食作物, 也是我国重要的粮食及大宗蔬菜作物, 随着世界人口的急剧增加、耕地面积的减少、大宗粮食作物种植效益的不断下降以及水资源短缺和膳食结构的改善, 马铃薯的重要性及马铃薯育种的紧迫性也日益显现。马铃薯属同源四倍体作物, 以无性繁殖为主, 遗传复杂^[1]。马铃薯育种目前仍以品种间杂交育种和芽变育种为主^[2]。对马铃薯种质资源的正确评价是育种的关键。

中国马铃薯种质资源的研究还很落后, 且主要应用的手段是形态比较、细胞学观察等^[1], 而分子水平的鉴定研究工作进行的较少。邱宏等^[3]利用 RAPD 和 AFLP 标记分析了我国主要马铃薯的遗传多样性, 认为中国马铃薯主栽品种从遗传组成上差异小, 遗传多样性差, 亲本来源单一, 遗传基础较为狭窄。李凤云等^[4]利用 RAPD 和 AFLP 分子标记技术对 19 份克新系列马铃薯品种进行遗传分析,

收稿日期: 2009-11-30

基金项目: 高产优质脱毒马铃薯品种的引种与示范(2008B022900008), 广东省科技厅; 优质高产脱毒马铃薯引种与产业化示范(2008-2), 湛江市科技局。

作者简介: 田大翠(1983-), 女, 硕士, 从事分子标记辅助育种研究。

* 通信作者: 朱宏波, 副教授, 从事作物分子遗传育种研究, E-mail: tdzhu@126.com。

认为克新系列马铃薯品种遗传基础有所拓宽。何凤发等^[5]利用 SRAP 分子标记对 44 份马铃薯的遗传多样性进行了分析, 将所选品种在血统上分为了四大类群。姚国胜等^[6]利用 SSR 分子标记对来自河北和黑龙江两个省份的 58 个马铃薯晚疫病菌株基因组 DNA 进行 SSR 基因型鉴定, 分别将两省的菌株分为 4 个和 2 个 SSR 基因型。利用分子标记手段对种质资源进行准确、科学的鉴定和评价, 明晰材料的遗传基础, 可为育种工作提供分子依据, 对马铃薯种质资源的收集、保存和利用都具有重要的意义。

本研究利用 ISSR 分子标记技术, 对中国各地马铃薯品种和部分国外品种进行遗传多样性分析, 从分子水平分析中国各地马铃薯品种间遗传关系及遗传基础, 为马铃薯品种的进一步开发和利用以及种质鉴定提供分子依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料品种和来源见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 制备

采用 SDS 法提取马铃薯基因组 DNA^[7]。

1.2.2 PCR 反应与电泳

引物和 dNTPs 由上海生工合成, Taq DNA 聚合酶为实验室自产。采用 20 μL 的反应体系进行 PCR 扩增, 反应体系: Taq 酶 0.3 μL(1U), 2 μL 的 10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺), 模板 DNA 1 μL(1 ug), 10 mM dNTP 0.15 μL, 引物 1 μL, 加水补齐至 20 μL。扩增参数为: 94℃预变性 5 min, 然后进行 40 个循环: 94℃变性 45 s, 52℃退火 45 s, 72℃延伸 2 min, 最后 72℃延伸 5 min, 20℃终止反应。PCR 产物在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离、银染、读带。

1.2.3 数据分析

电泳结果的每条 DNA 谱带为 1 个单位, 同一 ISSR 位点上有带的赋值为 1, 无带的赋值为 0, 统计结果以 1、0 矩阵输入计算机, 建立数据库, 用 NTSYS-ps 软件处理数据, 并对材料进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

从 60 条 ISSR 引物中筛选出 10 条能够在马铃薯基因组 DNA 中扩增出清晰条带的引物(表 2)。

表 1 试验材料来源与编号

Table 1 The origin and code number of materials

| 编号 Code | 名称 Name | 母本 Female parent | 父本 Male parent | 来源 Origin |
|------------|------------|---------------------|-------------------|--------------|
| 1 | 抗青 9-1 | BR63.5 | 104.12LB | 云南 |
| 2 | OE02-24-39 | - | - | 云南 |
| 3 | S02-106 | - | - | 云南 |
| 4 | 费乌瑞它 | ZPC50-35 | ZPC55-37 | 荷兰 |
| 5 | 尤金 | NS80-31 | 8023-10 | 辽宁 |
| 6 | 克新 20 号 | Fortuna | 克新 2 号 | 黑龙江 |
| 7 | 富金 | 8837-2 | 尤金 | 辽宁 |
| 8 | 241 | - | - | 黑龙江 |
| 9 | 中薯 3 号 | 京丰 1 号 | BF67A | 中国农科院 |
| 10 | 中薯 1 号 | 东农 303 | NS79-12-1 | 中国农科院 |
| 11 | DD419 | Cicero | Sprint | 黑龙江 |
| 12 | 克新 21 号 | Superior | Hampton | 黑龙江 |
| 13 | 克新 13 号 | Mira | Mira | 黑龙江 |
| 14 | 克新 17 号 | F81109 | B5141-6 | 黑龙江 |
| 15 | 克新 16 号 | 北方红 | 克 BP9601 | 黑龙江 |
| 16 | 黑美人 | - | - | 甘肃 |
| 17 | 大西洋 | Wauseon | B5141-6 | 美国 |
| 18 | YN-1 | - | - | 云南 |
| 19 | S02-136 | - | - | 云南 |
| 20 | 克新 18 号 | Epoka | 374-128 | 黑龙江 |

注: 部分品系或品种的亲本暂不可知。

Note: Parents of some varieties and clones are unknown.

表 2 ISSR 分析所用引物序列和扩增结果

Table 2 The primers alignment and amplified results of ISSR analysis

| 引物编号 Number of primer | 引物序列 Primer sequence (5'-3') | 扩增条带数 Total band number | 多态性 Polymorphic | |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|
| | | | 条带数 Band number | 百分率(%) Percentage |
| UBC807 | (AG) ₈ T | 2 | 2 | 100.00 |
| UBC810 | (GA) ₈ T | 6 | 4 | 66.67 |
| UBC812 | (GA) ₈ A | 2 | 1 | 50.00 |
| UBC835 | (AG) ₈ YC | 4 | 4 | 100.00 |
| UBC836 | (AG) ₈ YA | 8 | 7 | 87.50 |
| UBC840 | (GA) ₈ YT | 7 | 6 | 85.71 |
| UBC842 | (GA) ₈ YG | 5 | 3 | 60.00 |
| UBC849 | (GT) ₈ YA | 4 | 4 | 100.00 |
| UBC850 | (GT) ₈ YC | 13 | 13 | 100.00 |
| UBC855 | (AC) ₈ YT | 6 | 4 | 66.67 |

注: Y=(C 或 G)

Note: Y=(C or G)

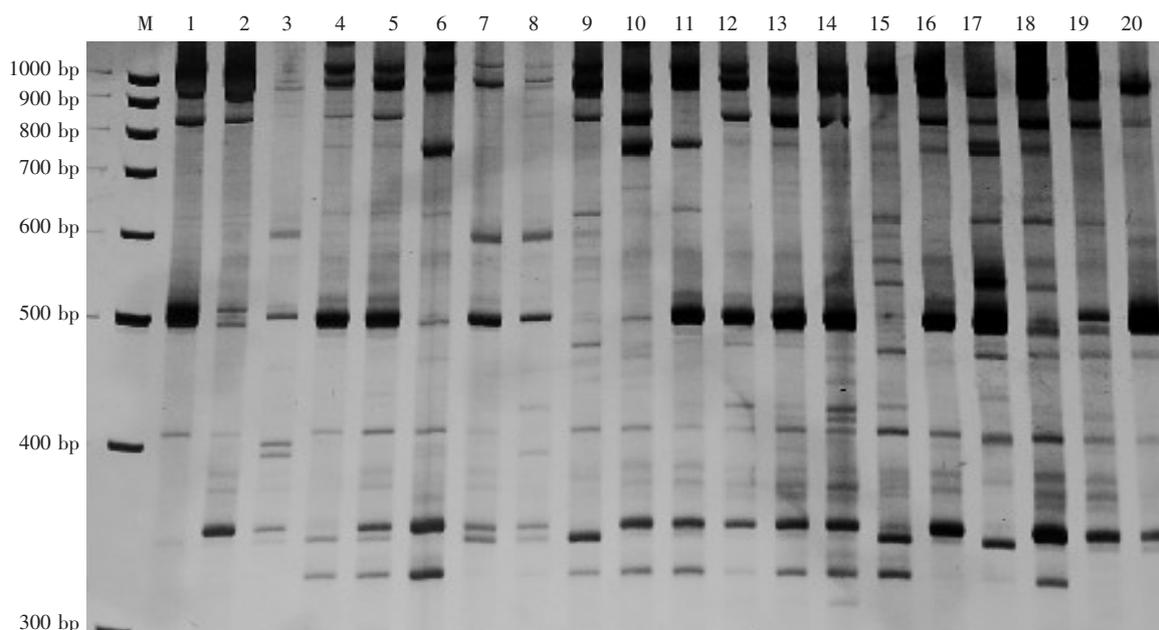


图 1 引物 UBC 850 在不同马铃薯材料中的 ISSR 图谱

Figure 1 Electrophoresis diagram of different potatoes by ISSR primer UBC850

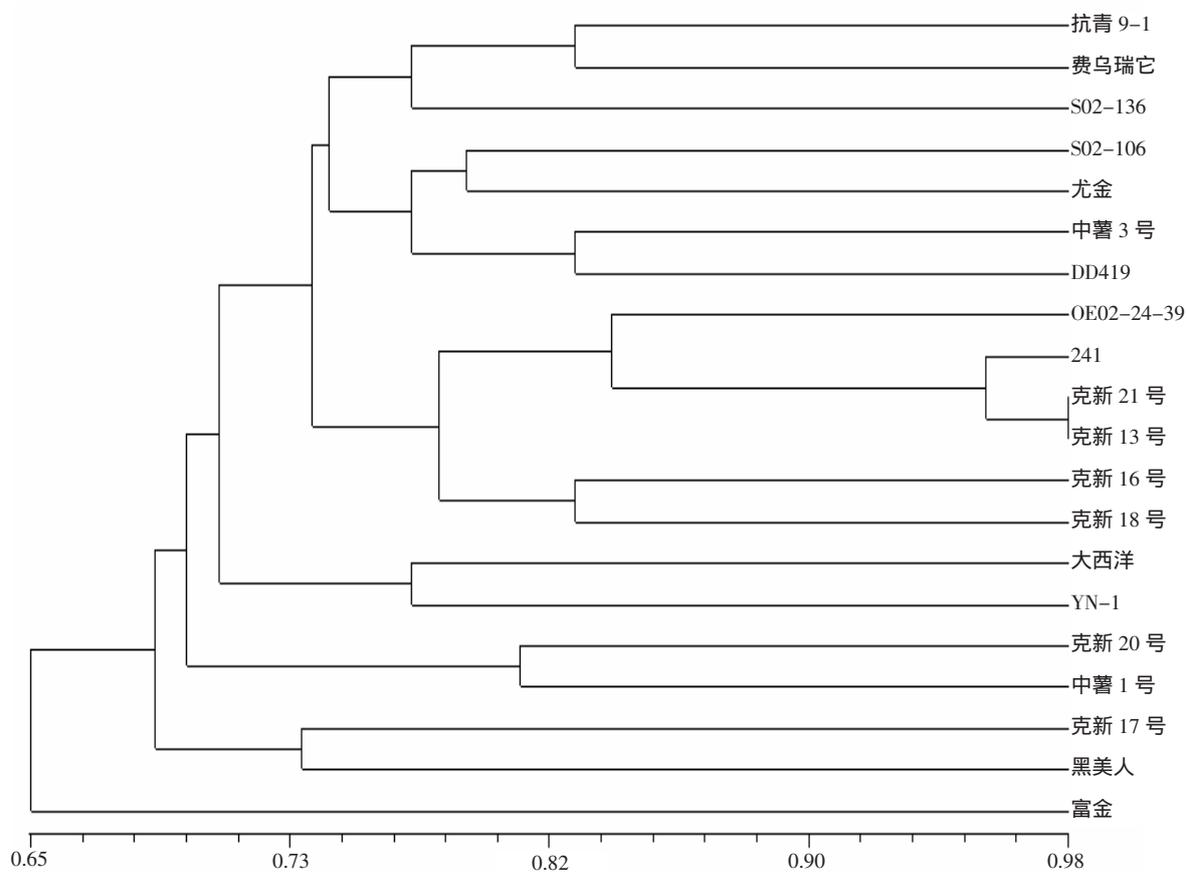


图 2 20 份马铃薯材料基于 ISSR 分析的 UPGMA 聚类图

Figure 2 Dendrogram of 20 potatoes varieties based on ISSR markers

表3 基于 ISSR 数据计算的 20 份供试材料之间的相似系数
Table 3 Genetic similarity of 20 tested materials based on ISSR analysis

| 编号 Code | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.7895 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.7719 | 0.7719 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.8246 | 0.6842 | 0.7719 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.6667 | 0.7018 | 0.7895 | 0.7719 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.7193 | 0.7018 | 0.7018 | 0.7193 | 0.7018 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.6316 | 0.6667 | 0.7544 | 0.7018 | 0.7544 | 0.5263 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.7368 | 0.807 | 0.7895 | 0.7018 | 0.7193 | 0.7193 | 0.6140 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.6842 | 0.7544 | 0.7368 | 0.7895 | 0.8070 | 0.7193 | 0.6667 | 0.7018 | 1 | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.7193 | 0.7193 | 0.6667 | 0.7193 | 0.7368 | 0.8070 | 0.5965 | 0.6667 | 0.6842 | 1 | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.6140 | 0.6842 | 0.6842 | 0.6140 | 0.6842 | 0.6842 | 0.5439 | 0.7018 | 0.7018 | 0.6316 | 1 | | | | | | | | | |
| 12 | 0.7895 | 0.8596 | 0.7719 | 0.7193 | 0.7368 | 0.7018 | 0.6316 | 0.9474 | 0.7193 | 0.7368 | 0.7368 | 1 | | | | | | | | |
| 13 | 0.7719 | 0.8421 | 0.7895 | 0.7018 | 0.7193 | 0.7193 | 0.6140 | 0.9649 | 0.7018 | 0.7018 | 0.7368 | 0.9825 | 1 | | | | | | | |
| 14 | 0.7018 | 0.7018 | 0.6842 | 0.7368 | 0.7193 | 0.7368 | 0.6140 | 0.6491 | 0.8070 | 0.6316 | 0.5789 | 0.6667 | 0.6491 | 1 | | | | | | |
| 15 | 0.7719 | 0.7719 | 0.7895 | 0.7018 | 0.6842 | 0.6667 | 0.6491 | 0.8246 | 0.7018 | 0.5965 | 0.6842 | 0.8070 | 0.8246 | 0.7193 | 1 | | | | | |
| 16 | 0.7193 | 0.6842 | 0.7368 | 0.7544 | 0.6667 | 0.6842 | 0.7018 | 0.7018 | 0.7193 | 0.6491 | 0.5614 | 0.6842 | 0.7018 | 0.7368 | 0.7018 | 1 | | | | |
| 17 | 0.7193 | 0.7895 | 0.7017 | 0.6491 | 0.6667 | 0.7193 | 0.6316 | 0.6667 | 0.7193 | 0.7544 | 0.6491 | 0.7193 | 0.7018 | 0.7018 | 0.6140 | 0.6140 | 1 | | | |
| 18 | 0.7719 | 0.8070 | 0.6842 | 0.7018 | 0.7193 | 0.6316 | 0.6842 | 0.6491 | 0.6667 | 0.7018 | 0.5965 | 0.7018 | 0.6842 | 0.6491 | 0.7193 | 0.5965 | 0.7719 | 1 | | |
| 19 | 0.7895 | 0.7895 | 0.7719 | 0.7544 | 0.7368 | 0.7543 | 0.6667 | 0.7719 | 0.7544 | 0.6842 | 0.7193 | 0.7895 | 0.7719 | 0.7018 | 0.7368 | 0.6842 | 0.7544 | 0.7018 | 1 | |
| 20 | 0.7368 | 0.7368 | 0.6491 | 0.7018 | 0.6842 | 0.6491 | 0.6140 | 0.7544 | 0.6667 | 0.6316 | 0.5789 | 0.7719 | 0.7544 | 0.7193 | 0.8246 | 0.6316 | 0.7018 | 0.7193 | 0.7018 | 1 |

10 条引物共计扩增出 57 条 DNA 条带, 其中多态性条带 48 条, 多态率为 84.21%, 不同引物扩增的多态比率分布在 50%~100%, 引物的 PIC 值平均为 0.2055。每个引物扩增的 DNA 条带数在 2~13 之间, 平均 5.7 条。扩增条带数最多的引物为 UBC 850, 达 13 条, 扩增条带数最少的引物为 UBC 807 和 UBC 812, 扩增条带为 2 条(图 1)。

2.2 聚类分析

聚类分析结果如表 3, 20 份马铃薯材料的遗传相似系数在 0.5263~0.9825 之间, 平均相似系数为 0.7220, 其中克新 13 号和克新 21 号之间遗传相似系数最大, 为 0.9825, 其次是 241 和克新 13 号, 为 0.9474, 说明它们的亲缘关系非常近。遗传相似系数最小的是克新 20 号和富金, 为 0.5263, 其次是富金和 DD419, 为 0.5439。富金和中薯 1 号, 黑美人和 YN-1, 中薯 1 号和克新 16 号之间也比较小, 为 0.5965, 表明它们之间遗传差异较大。总体来说, 所选择的马铃薯材料间的亲缘关系比较远, 反映出中国马铃薯品种的遗传关系比较远, 在育种上可以利用的空间比较大。

通过聚类分析可知(图 2), 在相似系数为 0.73 附近, 20 份马铃薯材料分为五大类, 富金单独是一类, 第二类有 2 个品种, 即克新 17 号和黑美人, 大西洋和 YN-1 为第三大类, 克新 20 号和中薯 1 号为第四类, 其余归到第五大类。第五大类又可以分为三个亚类。抗青 9-1 与来自荷兰的品种费乌瑞它亲缘关系较近, 克新系列相对较集中, 且多和 Mira、Epoka 有亲缘关系, 但克新 17 号和黑美人有血缘关系, 克新 20 号有了 Fortuna 的血缘, 说明克新系列也在不断的拓展其亲本来源。而作为富金的父本, 尤金并没有和富金聚在一起, 这可能是由于其多倍体的特点使得尤金在作父本时所产生的配子具有了遗传差异。

3 讨论

3.1 ISSR 分子标记用于马铃薯遗传多样性的分析

ISSR 标记作为以 PCR 为基础的分子标记, 除了具有操作简单的优点外, 还具有稳定和多样条带丰富的优点, 近年来在遗传多样性分析领域被广泛应用^[8-11]。本试验利用 10 条 ISSR 引物将 20 份马铃

薯材料完全区分开来, 试验结果与前人基本一致, 说明 ISSR 分子标记适用于马铃薯种质资源遗传多样性的分析。另外, 我们在读带的时候只读取了完全清晰可辨的条带, 虽然这在一定程度上会降低条带的丰富性, 但却保证了结果的准确性。

3.2 国内马铃薯品种的遗传多样性研究

已有研究表明, 我国马铃薯主栽品种整体上遗传基础较为狭窄, 遗传组成上差异小, 遗传多样性差, 且存在地域差异小的特点, 不同地方品种间的交流比较小。本研究表明, 我国既有品种中有许多和现在的主栽品种之间遗传差异还是很大, 马铃薯育种工作中应该加强对这些品种和一些野生资源的利用, 尽量拓宽亲本来源^[12-13]。随着马铃薯育种研究的不断发展, 地方品种间的交流将更加密切, 野生种和来自国外的优良品种在中国马铃薯育种中将发挥巨大作用。

[参 考 文 献]

- [1] 刘福翠, 谭学林, 郭华春. 云南省马铃薯品种资源的 RAPD 分析[J]. 西南农业学报, 2004, 17:200-204.
- [2] 戴朝曦. 用生物技术改革马铃薯育种方法[C]. 甘肃省遗传学会论文集, 1993:6-12.
- [3] 邱宏, 陈伊里, 金黎平, 等. RAPD 和 AFLP 标记分析中国马铃薯主要品种的遗传多样性[J]. 作物学报, 2006, 32(6):899-904.
- [4] 李凤云, 盛万民, 刘昭军. 马铃薯品种遗传多样性的 RAPD 和 AFLP 标记分析[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(5):266-270.
- [5] 何凤发, 杨志平, 张正圣, 等. 马铃薯遗传资源多样性的 SRAP 分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6):1001-1005.
- [6] 姚国胜, 王俊山, 杨英茹, 等. 河北省和黑龙江省马铃薯晚疫病病菌 SSR 基因型分析[J]. 科技导报, 2008, 26(5):35-39.
- [7] 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1):1-5.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [9] 毛伟海, 杜黎明, 包崇来, 等. 我国南方长茄种质资源的 ISSR 标记分析[J]. 园艺学报, 2006, 3(5):1109-1112.
- [10] 郑玉红, 夏冰, 杭悦宇, 等. 黄独遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(10):2011-2017.
- [11] 马艳明, 李斯深, 范玉顶, 等. 黄淮海区小麦品种(系)的 ISSR 位点遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(1):13-17.
- [12] 邱宏, 陈伊里. AFLP 技术在马铃薯育种中的应用[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(2): 98-101.
- [13] 宋吉轩, 范士杰, 邓宽平, 等. 分子标记技术在马铃薯育种中的应用[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(5):72-75.