

白花泡桐 11 个种源间亲缘关系的 ISSR 分析

陈政璋, 邹明洋* (广西绿树农林科技有限公司, 广西南宁 530000)

摘要 [目的]对白花泡桐 11 个种源间亲缘关系进行 ISSR 分析。[方法]选取 10 个不同地理种源的白花泡桐个体及“绿树”(又名新桐)无性系组培苗为研究对象,采用 ISSR 分子标记进行分析。[结果]共筛选出 22 对有效引物,扩增出 112 条带,其中有 67 条多态带,多态性比例为 59.82%。根据 ISSR 聚类分析结果,在遗传距离为 0.280 时,11 份白花泡桐材料可分为 6 类,第 1 类为江西、福建种源个体;第 2 类为“绿树”无性系与湖南、湖北、河南、浙江种源个体;第 3 类为江苏种源个体;第 4 类为河北种源个体;第 5 类为广西种源个体;第 6 类为广东种源个体。[结论]筛选得到的引物可以有效地将不同种源加以区分,并且能准确地将“绿树”无性系从众多种源中鉴定出来,该研究结果一方面为白花泡桐的品种选育提供分子辅助育种的技术支持,另一方面也有助于“绿树”无性系的鉴定及知识产权的维护。

关键词 白花泡桐;亲缘关系;简单重复序列区间扩增多态性(ISSR)

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)27-0155-02

Genetic Relationship of 11 *Paulownia fortunei* Individuals Detected by ISSR Analysis

CHEN Zheng-zhang, ZOU Ming-yang* (Guangxi Lvshu Agriculture and Forestry Science and Technology Co., Ltd., Nanning, Guangxi 530000)

Abstract [Objective]The genetic relationship of 11 *Paulownia fortunei* individuals was detected by ISSR analysis. [Method]10 *P. fortunei* individuals of different provenances and Lüshu clones tissue culture seedlings were analyzed by ISSR. [Result]22 pairs of effective primers were screened and 112 bands were amplified, including 67 polymorphic bands with a polymorphism ratio of 59.82%. All these individuals could be divided into six groups when genetic distance was 0.280 by ISSR cluster analysis. The first group was consisted of Jiangxi and Fujian provenances individuals. The second group was consisted of Lüshu clone, Hunan, Hubei, Henan and Zhejiang provenances individuals. The third group was consisted of Jiangsu provenances individual. The fourth group was consisted of Hebei provenances individual. The fifth group was consisted of Guangxi provenances individual, and the sixth group was consisted of Guangdong provenances individual. [Conclusion] These screened primers could effectively distinguish different provenances, and identify Lüshu clones accurately, which provide a molecular assisted breeding method for *P. fortunei*'s breeding and it is helpful for authentication and protection of intellectual property of Lüshu clones.

Key words *Paulownia fortunei*; Genetic relationship; Inter-simple sequence repeat (ISSR)

白花泡桐(*Paulownia fortunei*)原产于我国,其生长迅速,主干端直,叶密而大,对盐碱、干旱、贫瘠生长环境具有较强的抗性,适于作为城市绿化和生态保护树种^[1],同时其木材容易加工,具备耐酸耐腐、防湿隔热的优良特性,是一种兼具生态效益和经济价值的优良树种^[2]。白花泡桐在我国分布区域广,种质资源丰富,经过科研人员的多年研究,目前已经获得了多个白花泡桐优良品种^[3]。“绿树”(又名新桐)为广西绿树农林科技有限公司选育的优良泡桐品系,具有生长快、出材率高、木材硬度强等优点,为目前广西区内推广种植面积较大的主流品种。在对白花泡桐的选育、种植研究中发现,不同种源生长速度、木材品质、植株抗性等差异极大^[4],因此,鉴定分析泡桐地理种质资源,对其开发利用和良种选育极为重要^[5]。

ISSR(inter-simple sequence repeat)是一种新型分子标记,在林木遗传多样性、种质资源鉴定等研究中应用较多,其易于操作,稳定性高,目前广泛应用于林木品种的种源分析和个体 DNA 鉴定^[6-7]。该研究利用 ISSR 技术对 11 个白花泡桐材料进行分析,揭示地理种源间的亲缘进化关系,筛选出种源间 DNA 鉴定的特异性引物,以期为后续良种选育及知识产权保护提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料 各种源白花泡桐及“绿树”无性系组培苗均采自

广西绿树农林科技有限公司种质资源收集圃。DNA 提取、PCR Mix 试剂盒购自北京天根公司,PCR 扩增引物参照哥伦比亚大学(UBC)2006 年公布的 ISSR 引物序列,由上海生工生物技术有限公司合成。其余生化试剂购自当地试剂公司。

1.2 样品采集及总 DNA 提取 分别收集来自江西、浙江、河南、福建、广东、湖北、湖南、江苏、河北、广西 10 个省(自治区)的野生白花泡桐叶片样本,同时采集“绿树”叶片样本,编号 1~11。新鲜叶片采集后,擦拭干净并置于自封袋内,放入足量硅胶干燥处理。称取 0.1 g 左右的干叶,液氮研磨,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根)说明书方法提取总 DNA。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并用 Nano Drop 2000(Thermo)检测 DNA 含量和纯度。

1.3 ISSR 反应体系与扩增条件 按照 2 × *Taq* PCR Master Mix(天根)说明书方法配制 25 μL 的 ISSR 反应体系,扩增条件参照覃子海等^[8]所述方法,设为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,52 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 2 min,38 个循环;72 °C 保存 5 min,最后 4 °C 保存。

1.4 引物筛选及分析 分别以 11 份白花泡桐样本的总 DNA 为模板,用 100 条 ISSR 引物分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖电泳后,按照相同迁移位置上有扩增条带记为“1”、无则记为“0”的方法记录每个引物的电泳谱带,将“0”“1”数据输入 Excel 表格中,采用 UPGMA 法,在 DPSv 3.01 统计分析软件中进行聚类分析^[9-10]。

2 结果与分析

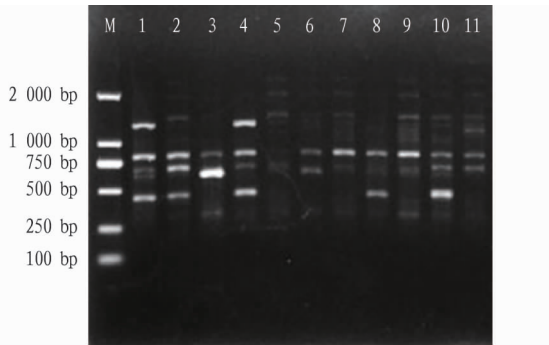
2.1 ISSR 条带和多态性分析 利用 100 条引物对试验材

作者简介 陈政璋(1977—),男,广东佛山人,工程师,从事林业实用技术推广工作。* 通讯作者,高级工程师,从事林业生物技术应用研究。

收稿日期 2017-07-05

料进行 ISSR-PCR 扩增,筛选得到 22 对条带清晰、扩增稳定、多态性高的有效引物,引物编号分别为 UBC807、UBC808、UBC809、UBC810、UBC817、UBC821、UBC825、UBC826、UBC828、UBC829、UBC830、UBC835、UBC836、UBC842、UBC846、UBC851、UBC856、UBC857、UBC862、UBC864、UBC886、UBC890。

22 对引物共扩增到 112 条 DNA 条带,其中多态性条带有 67 条,多态性比例为 59.82%;每个引物扩增出的 ISSR 多态性条带在 4~12,平均每个引物能扩增出 5.09 个多态性条带;扩增片段大小在 100~2 000 bp,其中引物 UBC846 扩增结果见图 1。



注:M 为 Marker;1~11 为 UBC846 引物对 11 份 DNA 样本扩增产物
Note:M is Marker,1-11 are amplification products of 11 *P. fortunei* individuals by using primer UBC846

图 1 引物 UBC846 对 11 份白花泡桐样品的 ISSR-PCR 扩增谱带
Fig.1 ISSR-PCR bands of 11 *P. fortunei* individuals by using primer UBC846

2.2 11 份白花泡桐 ISSR 聚类分析 按邓紫宇等^[7]方法计算遗传距离,结果表明“绿树”无性系与湖南种源个体之间的遗传距离最近(遗传距离为 0.059),与福建种源个体之间的遗传距离最远(遗传距离为 0.445)。在遗传距离为 0.280 时,11 份白花泡桐材料可分为 6 类,第 1 类为江西、福建种源个体;第 2 类为“绿树”无性系与湖南、湖北、河南、浙江种源个体;第 3 类为江苏种源个体;第 4 类为河北种源个体;第 5 类为广西种源个体;第 6 类为广东种源个体(图 2)。

3 结论与讨论

该研究中的试验材料除“绿树”无性系外,分别为来自 10 个不同省(区)的种源,通过 ISSR 分析发现种源间的亲缘关系与地理分布相符合,临近省份的种源间遗传距离较近,与植物自然分布规律相一致,说明白花泡桐分布可能以野生林分为主,人工林分较少。

在遗传距离为 0.280 时,湖南、湖北、河南种源遗传距离

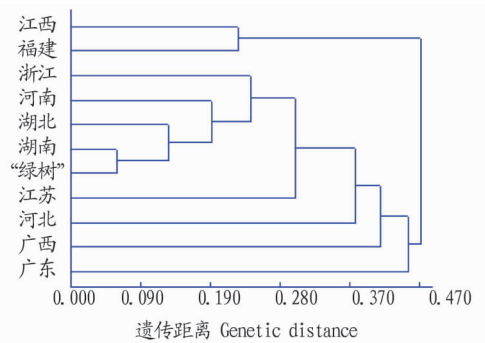


图 2 11 份白花泡桐的 ISSR 遗传关系树状图(UPGMA)

Fig.2 Tree diagram on ISSR genetic relationship of 11 *P. fortunei* individuals(UPGMA)

较近,聚为一类,江西和福建遗传距离较近,聚为一类。在遗传距离为 0.390 时,河北与河南可以聚为一类,江苏与浙江也可聚为一类,这些遗传距离的关系都和其地理距离的关系一致。“绿树”无性系与湖南种源关系最近,这与其品种选育来源相符,也证实了该研究结果的可靠性。湖南与广西地理距离近,这也是“绿树”无性系能成功在广西自治区内推广的原因之一。

从 ISSR 多态性分析来看,筛选得到的引物可以有效地将不同种源加以区分,并且能准确将“绿树”无性系在众多种源中鉴定出来。在生产应用中,可以此为基础,建立泡桐种质资源的快速 DNA 分子鉴定方法,一方面为白花泡桐的品种选育提供分子辅助育种的技术支持,另一方面也可用于“绿树”无性系的鉴定及知识产权的维护。

参考文献

- [1] 樊巍,赵东,王齐瑞,等.泡桐农田防护林带单株树冠结构特征[J].中国农学通报,2012,28(7):85-88.
- [2] 罗江华,李科,恩特马克·布拉提白.白花泡桐的研究进展[J].贵州农业科学,2010,38(4):200-203.
- [3] 王华玉,沈元勤,李怡忱,等.泡桐优良资源选择研究初报[J].湖北林业科技,2011(1):21-23.
- [4] 常德龙,张云岭,胡伟华,等.不同种类泡桐的基本材性[J].东北林业大学学报,2014(8):79-81.
- [5] 韩黎雪,常德龙,张云岭,等.人工林泡桐木材不同生长部位材色的差异性[J].东北林业大学学报,2014(10):95-99.
- [6] 李龙梅,石晓蒙,蒋维昕,等.广西境内马褂木天然群体遗传多样性的 ISSR 分析[J].广西植物,2017,37(1):22-28.
- [7] 邓紫宇,郭东强,陈健波,等.邓恩桉遗传多样性的 ISSR 分析[J].福建林业科技,2016(4):17-20.
- [8] 覃子海,黄金使,刘海龙,等.桉树的 ISSR 反应体系建立及优化[J].广西林业科学,2007,36(4):196-198.
- [9] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002:185-260.
- [10] 刘海龙,马锦林,张日清,等.11 份山茶属植物亲缘关系的 ISSR 分析[J].经济林研究,2012,30(4):87-90.
- [11] 樊巍,赵东,王齐瑞,等.泡桐农田防护林带单株树冠结构特征[J].中国农学通报,2012,28(7):85-88.
- [12] 罗江华,李科,恩特马克·布拉提白.白花泡桐的研究进展[J].贵州农业科学,2010,38(4):200-203.
- [13] LUPINI C, GIOVANARDI D, PESENTE P, et al. A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy [J]. Avian Pathol, 2016, 45(4): 1-22.
- [14] SHABBIR M Z, ALI M, ABBAS M, et al. Molecular characterization of infectious bursal disease viruses from Pakistan [J]. Arch Virol, 2016, 161(7): 1-6.
- [15] 韩玉婷,何勇,许革学,等.鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白及其疫苗的研究进展[J].河南农业科学,2016,45(3):20-23.

(上接第 154 页)