

丁芳兵,孙伟博,原雅玲,等. 秦岭地区野生山丹遗传多样性表型及 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):24-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.005

秦岭地区野生山丹遗传多样性表型及 ISSR 分析

丁芳兵¹, 孙伟博², 原雅玲¹, 寻路路¹, 张 蕾¹

(1. 陕西省西安植物园/陕西省植物研究所,陕西西安 710061; 2. 南京林业大学,江苏南京 210037)

摘要:对采自秦岭地区的 9 个山丹野生居群材料,采用表型结合内部简单序列重复(inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)分子标记进行遗传多样性分析。结果表明,9 个山丹居群 5 个表型性状中,除茎粗指标在 9 个居群之间差异不显著外,花柱长度、花丝长度、株高及鳞茎最宽直径 4 个表型性状中部分居群之间差异显著($P < 0.05$);用 ISSR 标记筛选获得的重复性好、条带清晰的 3 条引物进行 PCR 扩增,共扩增获得 235 个多态性位点,多态性比率为 45.0%,居群内多态性位点率在 36.5%~55.2%之间,居群的遗传多样性与居群地理位置相关性不显著。

关键词:山丹;秦岭地区;遗传多样性;ISSR;野生居群;多态性位点;表型性状

中图分类号: S324 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0024-03

秦岭山区及周边地区百合资源丰富。近年来,有许多关于秦岭地区川百合、卷丹、野百合等百合群体形态学水平上遗传多样性的研究报道,这些种在群体内或群体间具有丰富的多态性,主要表现在生长、形态存在显著差异^[1-5]。遗传多样性是指种内不同种群之间或同一种群不同个体间的遗传变异总和,除去个体水平上的形态发育差异,还包括细胞水平上的染色体差异及分子水平上的核酸、蛋白差异等。育种需要足够性状遗传多样性的种质资源,而分子生物学的发展为学者研究种质资源遗传多样性提供了更便捷、更精确的方法,目前,分析百合群体遗传多样性与亲缘关系的主要技术有即随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)、内部简单序列重复(inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)等^[6-8],其中 ISSR 标记重复性比 RAPD 好,操作简单、快速高效,且无需测序,是较适合百合研究的一项分子标记技术。

山丹(*Lilium pumilum*)作为药食两用百合,具有抗寒、抗旱、抗盐碱等多种优良性状,在秦岭地区广有分布,是百合杂交育种的优良亲本。目前,对秦岭地区山丹遗传多样性的研究非常有限,而利用表型性状和 ISSR 技术研究山丹不同居群的遗传多样性,不仅可以为分析山丹进化演变提供重要参考,而且可筛选出山丹不同居群的优良变异性状,为秦岭地区山丹资源的保护和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料来自秦岭山周边的营盘镇、佛坪县、小峪、大峪口、太白县等地,共计 9 个居群,分别于 2013、2014 年 5—9 月在秦岭山区及周边地区采集共计 30 余次,每个居群采样个体数 30 个,个体间避免为同一无性系。各采样点详细信息见表 1。

表 1 不同居群山丹采样点信息

居群	居群码	地理坐标	海拔 (m)	生长环境
营盘镇	SD1	33°79.463'N、109°05.494'E	1 200~1 320	林缘
佛坪县	SD2	33°52.025'N、107°99.287'E	820~980	邻近水源
长安区小峪	SD3	33°96.447'N、109°06.874'E	1 300~1 500	林缘
长安区大峪	SD4	34°02.181'N、109°12.525'E	1 450~1 600	林缘
太白县	SD5	33°99.324'N、107°32.269'E	1 500~2 200	灌木、草甸
户县东涝峪	SD6	33°95.981'N、108°54.519'E	800~960	林缘
秦岭祥峪	SD7	33°96.565'N、108°80.138'E	1 180~1 280	林缘
宁陕县火地塘	SD8	33°43.235'N、108°45.288'E	1 600~1 700	邻近水源
商洛县西柿沟	SD9	33°76.910'N、109°94.803'E	1 170~1 330	林缘

1.2 试验方法

1.2.1 表型性状调查 采用游标卡尺测量山丹的花柱长度、花丝长度、茎粗、鳞茎最宽处直径,使用米尺测量株高。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用天根生化科技(北京)有限公司生产的植物基因组 DNA 提取试剂盒,提取植株鳞茎最外部鳞片的 DNA;提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,DNA 样品于 -20 ℃ 冰箱内保存,备用。

收稿日期:2016-11-09

基金项目:陕西省科学院青年基金(编号:2012K-24)。

作者简介:丁芳兵(1983—),女,山东威海人,博士,助理研究员,主要从事园林观赏植物引种、驯化及育种工作。Tel: (029) 85251750; E-mail:flora1314dfb@126.com。

1.2.3 PCR 扩增和电泳 初筛选出 25 条引物,由上海 Invitrogen(英骏)生物技术有限公司进行合成;每个居群随机选择 2 个模板进行扩增,最终选择 P1:5′-CTCTCTCTCTCTCT TGA-3′、P2:5′-CTCTCTCTCTCTCTTAG-3′、P3:5′-CTCTC TCTCTCTCTTGT-3′这 3 条特征带清晰的引物进行 PCR 扩 增。反应体系为 20 μL;20 ~ 25 ng 模板 DNA 1 μL, *Taq* 酶 0.5 μL,10 μmol/L ISSR 引物 1 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 × buffer 4 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 60 s,55 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用聚丙烯酰胺凝 胶进行电泳,染色后进行条带分析。

1.3 数据处理与统计

表型性状数据采用 SPSS 19 软件进行分析比对。ISSR 结 果在 100 ~ 2 000 bp 范围内选取重复性良好且清晰的条带进 行记录统计,相同分子量片段对应 1 个多态性位点,有特异性 条带的记为 1,没有的记为 0。

表 2 山丹 9 个居群的表型性状						cm
居群	花柱长度	花丝长度	株高	茎粗	鳞茎最宽直径	
SD1	1.83 ± 0.06e	2.01 ± 0.07b	18.50 ± 1.40e	0.32 ± 0.03a	4.23 ± 0.09e	
SD2	1.83 ± 0.06e	2.14 ± 0.06b	20.74 ± 1.60e	0.35 ± 0.06a	4.66 ± 0.18e	
SD3	1.58 ± 0.07a	2.11 ± 0.11b	27.17 ± 0.98a	0.38 ± 0.08a	5.72 ± 0.26a	
SD4	1.76 ± 0.11e	2.29 ± 0.12b	20.00 ± 1.54e	0.32 ± 0.03a	4.47 ± 0.12e	
SD5	1.81 ± 0.05e	2.28 ± 0.10b	19.82 ± 1.66e	0.32 ± 0.03a	4.56 ± 0.16e	
SD6	1.84 ± 0.06e	2.30 ± 0.12b	21.02 ± 1.72e	0.32 ± 0.06a	4.43 ± 0.13e	
SD7	1.82 ± 0.07e	2.20 ± 0.09b	19.53 ± 1.11e	0.31 ± 0.05a	4.40 ± 0.46e	
SD8	1.63 ± 0.07b	1.81 ± 0.10a	25.40 ± 1.05b	0.37 ± 0.05a	5.58 ± 0.16b	
SD9	1.78 ± 0.11e	2.22 ± 0.08b	20.02 ± 1.20e	0.31 ± 0.02a	4.42 ± 0.15e	
平均值	1.76 ± 0.07	2.15 ± 0.09	21.36 ± 1.36	0.33 ± 0.05	4.45 ± 0.19	
居群间 <i>F</i> 值	17.404	27.232	44.069	3.058	109.082	

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 表型性状与地理环境因子的相关性

由表 3 可见,仅花丝长度与生长环境呈负相关,其他 4 个 表型性状与生长环境呈正相关;花柱、花丝长度与纬度及海拔 呈负相关,而株高、茎粗、鳞茎最宽直径与海拔呈正相关,茎粗、 鳞茎最宽直径与纬度呈负相关,株高与纬度呈微弱的正相关, 大部分相关性未达显著性,仅花丝长度与经度呈显著正相关 ($P < 0.05$),表明地理因素对大部分表型性状无决定性影响。

表 3 表型性状与地理环境相关性分析					
性状	相关系数				生长环境
	经度	纬度	海拔	生长环境	
花柱长度	0.174	-0.191	-0.438	0.040	
花丝长度	0.752 *	-0.025	-0.197	-0.102	
株高	-0.247	0.016	0.206	0.021	
茎粗	-0.458	-0.159	0.139	0.173	
鳞茎最宽直径	-0.345	-0.088	0.205	0.109	

注:“*”表示显著相关。

2.3 表型聚类分析

由图 1 可见,当遗传进化距离 $L = 2$ 时,野生山丹 9 个居 群中除 SD1、SD3、SD8 为 3 个独立居群外,可以将其他居群分 为 1 个大类,其中居群 SD3、SD8 生长环境不同,但海拔差异 相对较小;在分为 1 大类的 6 个居群中,居群 SD5 与其他 5 个

2 结果与分析

2.1 居群间表型性状变异分析

由表 2 可见,5 个表型性状中,山丹居群 SD3 的植株相对 最高、花柱相对最短、鳞茎最宽直径相对最大,居群 SD1 的植 株相对最矮、鳞茎最宽直径相对最小,居群 SD8 的花丝相对 最短,与其他居群差异显著($P < 0.05$);在茎粗指标上,9 个 居群差异不显著,表明其遗传稳定性相对较高;居群 SD3、SD8 的花柱长度、株高、鳞茎最宽直径与其他居群相比差异显著 ($P < 0.05$)。相关性分析结果表明,5 个表型性状仅在某些 居群中存在相关性,如居群 SD1、SD2、SD3、SD5、SD7 的株高 与茎粗呈正相关,居群 SD1、SD3、SD8 的花柱、花丝长度与鳞 茎最宽直径呈负相关,居群 SD4、SD5 的花柱、花丝长度与鳞 茎最宽直径呈正相关,表明 5 个表型性状在 9 个居群间的相 关性不高,居群特异性明显。方差分析结果表明,居群内各指 标的差异不显著。

居群生长环境有明显差别,这可能是由于山丹在秦岭地区的 迁徙经历海拔的变化,而迁徙线路环境的变化又造成山丹分 布的生态多样性,同时,在迁徙过程中,也造成相对独立生态 居群的产生。

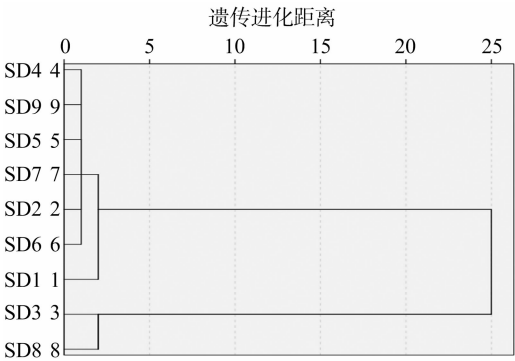
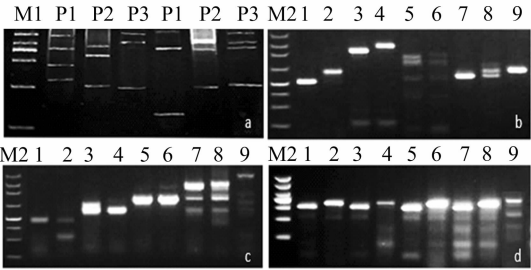


图1 基于表型性状构建的山丹聚类分析树

2.4 ISSR 多态性分析

由图 2 可见,从 25 条引物中筛选出的 3 条引物用于 PCR 扩增,条带数多且清晰。由表 4 可见,3 条引物扩增片段的多 态性比例平均值分别为 44.1%、40.3%、49.0%,引物扩增多 态性相对较低;不同引物扩增的多态性存在差异,说明山丹材



a—3 条引物选取随机材料扩增的结果；b、c、d—分别为引物 P1、P2、P3 对 9 个山丹居群部分材料的扩增结果。
M1—DL 2000 DNA ladder；M2—DL 2500 DNA ladder；
1~9—9 个山丹居群材料 SD1~SD9

图2 ISSR 引物的筛选结果及对部分材料的扩增结果

表 4 3 条引物的 ISSR 扩增结果

居群	引物 P1			引物 P2			引物 P3			3 条引物		
	总位点 (个)	多态性位 点(个)	多态性比 例(%)	总位点 (个)	多态性位 点(个)	多态性比 例(%)	总位点 (个)	多态性位 点(个)	多态性比 例(%)	总位点 (个)	多态性位 点(个)	多态性比 例(%)
SD1	20	13	65.0	17	8	47.1	21	11	52.4	58	32	55.2
SD2	21	10	47.6	22	9	40.9	24	11	45.8	67	30	44.8
SD3	17	5	29.4	13	7	53.8	17	9	52.9	47	21	44.7
SD4	16	5	31.3	16	5	31.3	20	9	45.0	52	19	36.5
SD5	17	7	41.2	16	5	31.3	19	8	42.1	52	20	38.5
SD6	19	7	36.8	15	6	40.0	21	9	42.9	55	22	40.0
SD7	21	11	52.4	19	7	36.8	22	10	45.5	62	28	45.2
SD8	22	10	45.5	19	7	36.8	24	16	66.7	65	33	50.8
SD9	21	10	47.6	20	9	45.0	23	11	47.8	64	30	46.9
合计	174	78		157	63		191	94		522	235	
平均值	19.3	8.7	44.1	17.4	7.0	40.3	21.2	10.4	49.0	58.0	26.1	45.0

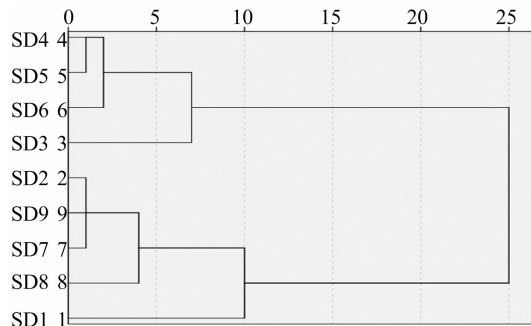


图3 基于 ISSR 标记结果构建的山丹聚类分析树

3 讨论

秦岭地区山丹居群大多数材料能够依据地理来源相对集中地聚在一类,如分别来自佛坪县(SD2)、户县东涝峪(SD6)的山丹居群海拔相近,分别来自长安区大峪(SD4)、太白县(SD5)、秦岭祥峪(SD7)、商洛县西柿沟(SD9)的 4 个居群纬度相近,且均分布在高海拔地区。同一类中居群有地理因子相差较大的,如 SD4、SD9 这 2 个居群的经度与 SD5 居群相差较远,这可能是起源相同的群体生长环境不同造成的。ISSR 聚类分析结果表明,山丹居群聚类与地理分布的关系不很明显,这与葛新新等的研究结果^[9]较为一致,这种相关性的不显著可能是由于采集地基本在秦岭附近,采样区域经纬度变化幅度有限,生态环境差异对遗传变异影响相对较小,有限的范围可能造成较多的基因交流,另外,对小生境的记录欠缺及利用鳞茎最宽直径进行 ISSR 标记可能技术不完善,都会

料遗传背景具有一定的复杂性;所有样品共检测到 522 个位点,其中多态性位点 235 个,多态性比例为 45.0%;3 条引物居群内多态性位点比例在 36.5%~55.2%之间,9 个居群中 SD1 遗传多样性水平相对最高,SD4 遗传多样性水平相对最低。

2.5 ISSR 分子标记聚类分析

由图 3 可见,9 个山丹居群根据 ISSR 标记结果可聚分为 2 个大类,居群 SD1、SD3、SD6、SD8 表现为相对独立的居群,居群 SD6 与 SD4、SD5 的亲缘关系相对更近,SD8 与 SD2、SD7、SD9 的亲缘关系相对更近。结合地理因子分析发现,山丹多样性变化的主要原因是海拔的改变,其次是随经纬度的改变而不同,但表型性状与地理因子的相关性不显著。

造成这种结果。不过,山丹表型性状与地理因子有一定的相关性,特别是花丝长度与经度呈显著正相关($P<0.05$),说明按经度分布可能是山丹的一条迁徙路线。ISSR 聚类结果表明,居群 SD7 与 SD9 亲缘关系相对较近,这两者在地理环境因素上比较相似,结合地理因子可以推断,秦岭地区山丹变异的首要因素可能是海拔的变化。

秦岭地区山丹资源丰富,能为我国山丹的育种栽培、种质改良创新提供大量原始材料,对这些野生山丹资源进行调查、收集和保存,能为将来秦巴山区山丹百合资源的分类提供依据,对山丹的引种保护及驯化栽培起到指导作用。当前,有不少百合研究工作者对秦岭地区山丹资源进行了相关调查与收集,但对遗传等问题未做深入研究,有的仅单独运用传统形态学归类法或 ISSR 分子标记技术,缺少对 2 种方法的综合运用。本研究综合利用形态学归类法和 ISSR 分子标记这 2 种方法,能更完善地解释秦岭地区山丹资源的遗传特性,可为将来秦巴山区的百合资源调查研究及开发利用提供重要依据。

参考文献:

[1] 赵祥云,陈新露,王树栋,等. 秦巴山区野生百合资源研究初报[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),1990(4):80-84.
[2] 向地英,张延龙,牛立新. 秦巴山区及毗邻地区野生百合的形态多样性研究[J]. 武汉植物学研究,2005,23(4):385-388.
[3] 车 飞,牛立新,张延龙,等. 秦巴山区野生百合资源及其生境土壤特性的调查[J]. 安徽农业科学,2008,36(23):9955-9957.
[4] 郭宇龙,张延龙,司国臣,等. 秦巴山区 5 种野生百合鳞片繁殖特性研究[J]. 西北林学院学报,2013,28(1):90-93,99.

龙凌云,毛立彦,黄寿辉,等. 蓝莓 *FLC* 基因电子克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):27-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.006

蓝莓 *FLC* 基因电子克隆及生物信息学分析

龙凌云,毛立彦,黄寿辉,檀小辉,於艳萍,郝小玲,庞新华

(广西壮族自治区亚热带作物研究所,广西南宁 530001)

摘要: *FLC* 基因是 MADS-box 家族的重要成员,参与调控植物花芽分化和开花过程,在春化作用中起关键作用。以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *FLC* 基因编码蛋白序列 (GenBank 登录号: AAN04056.1) 为探针,运用电子克隆方法获得蓝莓 (*Vaccinium* spp.) *FLC* 基因 (*VaFLC*) cDNA 序列,对其编码蛋白的理化性质、亲/疏水性、保守序列、二级结构和三级结构特点进行预测分析,并对该编码蛋白与其他植物中 *FLC* 基因编码蛋白的相似性和进化关系进行研究。结果表明,蓝莓 *FLC* 基因 cDNA 全长 1 303 bp,包含 1 个长度为 753 bp 的完整开放阅读框,编码 250 个氨基酸,编码蛋白含有 ME2-like MADS 域、I 域、K 域和 C 域 4 个明显的结构域,属于 MADS-box 基因家族中植物 II 型 (MIKC 型) 基因。在蓝莓 *FLC* 基因编码 *VaFLC* 蛋白与其他植物 *FLC* 蛋白的相似性方面,除与大豆的相似性为 38% 之外,与其他植物的相似性均高于 40%,其中与葡萄、柑橘具有 47% 的相似性,与拟南芥、可可树、白桦具有 46% 的相似性,与梨树具有 45% 的相似性。蓝莓 *VaFLC* 蛋白在系统进化树上归为木本植物分支,并形成独立的小分支,推测该基因及其编码蛋白在植物 *FLC* 进化过程中保留了部分原始特征。

关键词: 蓝莓; *FLC* 基因; 电子克隆; 生物信息学

中图分类号: Q785; S663.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0027-06

花是果树极为重要的生殖器官之一,而花芽分化是果树由营养生长向生殖生长转变的重要阶段,对果树的成花过程、花数量和坐果率起着关键作用。花芽分化的早晚和质量对农林果树生产的产量、质量有重要影响^[1]。温度是诱导植物花芽分化的关键环境因子之一,落叶果树通常要经历一个较低温度的积累量(即需冷量)才能够正常诱导花芽分化和开花,需冷量不足通常会导致果树花芽分化不完整,花器官畸形或严重败育^[2-3]。落叶果树花芽分化机制研究起步较晚,相关研究成果主要借鉴拟南芥等模式植物的研究。植物开花有 4 条不同途径,分别是依赖光周期的开花途径、自主开花途径、依赖春化的开花途径和赤霉素途径^[4]。*FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) 基因属于 MADS-box 基因家族成

员,在植物开花过程中具有重要作用^[5]。在拟南芥中,低温通过对 *AtFLC* 基因的转录及蛋白表达水平进行负调控,从而调控拟南芥花芽分化和成花过程^[6]。

蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 是一种具有独特保健作用和高营养价值的落叶果树,具有广阔的国际市场和发展潜力,我国自 20 世纪 80 年代开始开展蓝莓引种和商业化栽培,现已推广至东北三省、山东、浙江、云南、贵州、广东等多个省、区,栽培范围呈现由温带向亚热带、热带地区发展的趋势^[7-8]。蓝莓作为一种温带落叶果树,通过低温春化作用达到足量需冷量是保证其花芽正常分化并提高其农林业产量、质量的关键^[9-11]。近年来,国内相关科研院所和高校已经从引种栽培特性、形态结构、逆境胁迫响应等方面对温度如何影响蓝莓花芽分化的形态和生理生化机制开展了一系列研究^[12-16],但是关于低温调控蓝莓花芽分化的春化途径的分子机制研究较少,尤其是 *FLC* 基因响应温度变化调控花芽分化的春化途径分子机制方面的研究尚未见报道。

目前,随着多种模式植物全基因组测序的完成,众多分子相关数据库[如表达序列标签 (expressed sequence tag, 简称 EST) 数据库]的建立以及各类生物信息学软件的开发和应用,使借助生物信息学手段对植物 *FLC* 基因进行电子克隆、结构和功能预测分析与分子进化分析等研究,以及在较短时间和较低成本下获取大量可靠的基因、蛋白结构与功能信

收稿日期:2016-11-05

基金项目:广西亚热带作物研究所基本科研业务费专项资金(编号:桂热研 201507);广西科技厅科技计划(编号:桂科攻 1598006-1-1B)。

作者简介:龙凌云(1985—),男,广西融安人,硕士,助理研究员,主要从事小浆果果树逆境生理生化与分子生物学方面的研究。
E-mail: longyiyun851123@163.com。

通信作者:庞新华,硕士,高级农艺师,主要从事热带亚热带作物栽培与育种方面的研究工作。Tel: (0771) 2539056; E-mail: gscri@126.com。

[5] 梁振旭,张延龙,牛立新,等. 秦巴山区野百合表型多样性[J]. 广西植物,2014(6):727-733.

[6] 邓明文,吴祝华,席梦利,等. 岷江百合 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 林业科技开发,2007,21(6):19-22.

[7] 钟海丰,张延龙,牛立新. 秦巴山区野生山丹百合 DNA 提取与 RAPD 反应体系建立[J]. 西北农业学报,2008,17(3):285-

289.

[8] 丁信誉,邱帅,席梦利,等. 东方百合 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2012,36(5):42-46.

[9] 葛新新,张文革,郭太君,等. 长白山 3 种百合种内 ISSR 基因标记研究[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(3):270-275.