俞飞飞,周军永,陆丽娟,等. ISTR 标记在榧树种质资源遗传多样性分析中的应用[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):38 - 41.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2019.02.008

ISTR 标记在榧树种质资源遗传多样性分析中的应用

俞飞飞, 周军永, 陆丽娟, 孙其宝, 仇鹏辉
(安徽省农业科学院园艺研究所,安徽合肥 230031)

摘要:利用反向序列标签重复技术(inverse sequence - tagged repeat,ISTR)对 43 份安徽省榧树种质资源及 3 份浙江省榧树资源进行了遗传多样性分析。ISTR 能很好地用于榧树种质资源遗传多样性分析,多态性比例为 87.09%,46 份榧树种质遗传相似系数为 0.548 4 ~ 1.000 0,表明安徽省榧树种质资源遗传多样性较为丰富。采用 UPGMA(非加权组平均算法)对 46 份种质的 ISTR 数据进行聚类分析,结果显示可分为 3 个类群,来自同一地方的种质基本上都独立聚成类群,表明种质间亲缘关系与地理来源关系较为密切;相似的种质类型聚为一类,可能与实生繁殖方式有关。ISTR 标记可在榧树种质资源遗传多样性分析中被广泛地应用。

关键词:香榧;反向序列标签重复技术;遗传多样性
中图分类号: S791.530.1　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 - 1302(2019)02 - 0038 - 03

榧树(*Torreya grandis*)属裸子植物红豆杉科(Taxaceae)榧属(*Torreya*)常绿乔木,为第 3 纪孑遗植物,是我国特有的珍稀树种。安徽省榧树种质资源丰富,多呈野生或半野生状态,主要分布于黄山市的黟县、休宁县、歙县、徽州区和黄山区,宣城市的宁国市、宣州区和绩溪县,池州市的石台县有少量分布,此外,大别山区的霍邱、舒城等地也有零星分布[1-6]。

反向序列标签重复技术(inverse sequence - tagged repeat,ISTR)是逆转座子的分子标记,较常规分子标记灵敏[7],使用的是通用引物,免去了前期逆转座子特异引物开发步骤,降低了试验成本和提高了效率。目前已在椰子[8]、葡萄[9]、柑橘[10]和柿[11]等果树树种的指纹分析、遗传连锁图谱构建、系统进化分析和种质鉴定等研究中得到应用。

随着香榧经济价值的不断提高,榧树的种质资源开发和利用受到重视,特别注重优良品质的榧树资源利用,同时受到来自诸暨香榧等细榧品种的影响,安徽省很多野生和半野生的榧树被改接,从而造成榧树种质资源的流失,并且前人对安徽省榧树资源遗传多样性的研究很少。本试验拟探讨 ISTR 标记在榧树种质鉴定和亲缘关系分析中应用的可行性,以期为今后开展遗传多样性评价、雌雄性别鉴定、种质鉴定和亲缘关系分析等研究提供新的研究手段,对榧树资源的保存利用具有重要的研究意义。

1　材料与方法

本研究中所采用的榧树种质资源共 46 份(表 1),于 2017 年 6 月采自安徽省榧树主产区的宁国市、黟县、宣城等地;其中诸暨香榧引自浙江省诸暨市。试验于 2017 年 8 月在园艺作物种质创制及生理生态安徽省重点实验室进行。

采用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethylammonium ammonium bromide,CTAB)提取榧树叶片 DNA,DNA 终浓度稀释至 10 ng/μL 备用。ISTR 扩增及其产物检测参考 Rohde 的方法并作优化[8]。引物序列参考 Aga 等的报道[12](表 2),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增体系(20 μL):模板 DNA(2 μL),Buffer 1 ×(5 μL),Mg^{2+} 2.5×10^{-3} mol/L(5 μL),dNTP 2.5×10^{-3} mol/L(5 μL),*Taq* 酶 1 U(1 μL),引物 1.0×10^{-6} mol/L(2 μL)。扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,循环 35 次;72 ℃延伸 5 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 SYNGENE 凝胶成像系统观察和记录谱带。

PCR 扩增试验重复 2 次,不能重复的条带统计时忽略不计。强带、弱带均记为 1,同一位置无带记为 0,从而生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。用 NTSYS - pc 2.10 软件进行相似系数计算和基于非加权组平均算法(unweighted pair - group method with arithmetic means,UPGMA)的聚类分析,构建树状图,分析榧树种质资源亲缘关系。

2　结果与分析

2.1　ISTR 多态性分析

共筛选 12 对引物,其中 4 对引物的扩增谱带清晰且重复性好。由表 3 可见,4 对引物的扩增总带数为 31 条,27 条(占 87.10%)具多态性;扩增片段长度为 100 ~ 5 000 bp;单引物对多态位点比例为 77.78% ~ 100%;不同引物组合的种质鉴定能力差异较大,4 对引物组合可以将 46 份种质资源按来源地区分,证明 ISTR 可用于榧树种质资源遗传多样性研究。

2.2　品种及雌雄性鉴别

由 4 条引物扩增出的 27 个多态性位点,大多数谱带在供试材料间不具有独特性,来自宁国市方塘乡的种质资源和诸暨香榧多态性丰富,能与其他种质资源明显区分。图 1 结果显示,17 号样本为雄性榧树,在 500 bp 左右出现独特性扩增

收稿日期:2017 - 11 - 09
基金项目:安徽省农业科学院种子工程(编号:16D0306);安徽省农业科学院科技创新团队项目(编号:14C0302);安徽省农业科学院学科建设项目(编号:17A0309);安徽省果树产业技术体系项目(编号:皖农科函[2016]139 号)。
作者简介:俞飞飞(1965—),女,安徽宁国人,研究员,从事园艺作物新品种选育和栽培技术研究。E - mail:anhuiyufeifei@163.com。

表 1　安徽省及周边省份榧树种质资源样品

编号	试材类型	来源地	编号	试材类型	来源地	编号	试材类型	来源地
1	榧树	安徽省宁国市方塘乡	17	榧树(雄)	安徽省宁国市青龙乡	32	榧树(雌)	安徽省宣城市溪口镇
2	榧树	安徽省宁国市方塘乡	18	榧树(雄)	安徽省宁国市青龙乡	33	圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
3	榧树	安徽省宁国市方塘乡	19	榧树	安徽省宣城市水东镇	34	圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
4	榧树	安徽省宁国市方塘乡	20	榧树	安徽省宣城市水东镇	35	和尚榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
5	榧树	安徽省宁国市方塘乡	21	榧树	安徽省宣城市水东镇	36	诸暨香榧	浙江省绍兴市诸暨市
6	榧树	安徽省宁国市方塘乡	22	榧树	安徽省宣城市水东镇	37	圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
7	榧树	安徽省宁国市方塘乡	23	榧子	安徽省宣城市溪口镇	38	小米榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
8	诸暨香榧	浙江省绍兴市诸暨市	24	榧子(雄)	安徽省宣城市溪口镇	39	圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
9	诸暨香榧	浙江省绍兴市诸暨市	25	木榧	安徽省宣城市溪口镇	40	小圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
10	榧树	安徽省宁国市青龙乡	26	木榧	安徽省宣城市溪口镇	41	中圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
11	榧树	安徽省宁国市青龙乡	27	榧树	安徽省宣城市溪口镇	42	榧树(雄)	安徽黟县宏村镇泗溪村
12	榧树	安徽省宁国市青龙乡	28	转筋榧	安徽省宣城市溪口镇	43	中圆榧(雄)	安徽黟县宏村镇泗溪村
13	榧树	安徽省宁国市青龙乡	29	榧树	安徽省宣城市溪口镇	44	中圆榧(雌)	安徽黟县宏村镇泗溪村
14	榧树	安徽省宁国市青龙乡	30	榧树	安徽省宣城市溪口镇	45	小圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
15	榧树	安徽省宁国市青龙乡	31	榧树(雄)	安徽省宣城市溪口镇	46	中圆榧	安徽黟县宏村镇泗溪村
16	榧树	安徽省宁国市青龙乡						

注:17 和 18 号、43 和 44 号分别为雌雄同株树上采集的结果枝条和开雄花枝条的叶片。其他未标注的均为雌树。

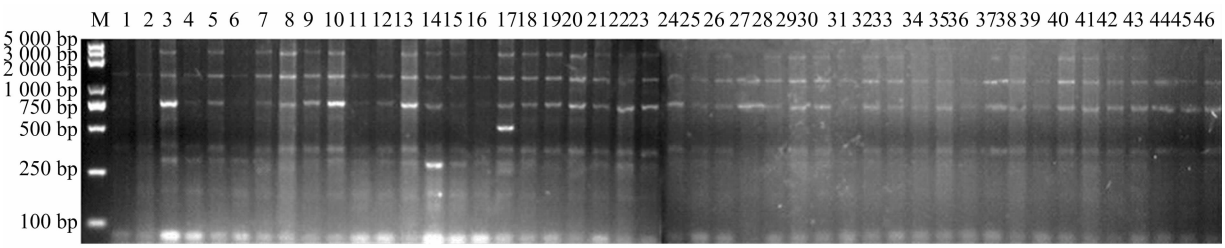
表 2　ISTR 引物序列

正向引物(5′→3′)	反向引物(5′→3′)
F2:AAAATGTAGTCTCTC	B3:ATTCCCATCTGCACCAAT
F3:GTCGACATGCCATCTTTC	B5:CTTCTGTGAAAGTCCTAG
F5:ATATATGGACTTAAGCAAGC	B6:ATATATGGACTTAAGCAAGCA
F8:TTGGACAACCATATTTTGACT	B7:GGAATATCATTCCCAATAAG
F9:ATATGGACTTAAGCAAGCCA	B8:CCTCCTTATTGGGAATGATAT
F10:GATCAAAAAGTTTGGTTTCAT	B10:GACCCTTTTGAAAACACATG

位点,与雌性榧树有明显区分,作为雌雄性鉴定的依据有待于进一步研究。

表 3　选用 4 对引物产生的谱带信息

引物组合	总带数(条)	多态性带数(条)	多态性比例(%)
F2/B3	7	6	85.71
F3/B5	6	6	100.00
F8/B5	9	8	88.89
F8/B6	9	7	77.78



编号同表 1

图1　F8/B6 引物组合对供试榧树种质基因型的 ISTR 扩增谱带

2.3　基于 ISTR 的相似指数及亲缘关系分析

46 份榧树种质遗传相似系数为 0.548 4 ~ 1.000 0,表明安徽榧树种质资源遗传多样性较为丰富,其中来自黟县的圆榧类种质的相似系数最大,为 1.000 0,表明圆榧类的亲缘关系最近。

采用 UPGMA 法,根据相似系数对 46 份榧树种质进行聚类分析(图 2),在相似系数为 0.82 时,46 份种质可分为 3 个类群。第 1 类群包含 2 份种质,来自宁国市方塘乡。

第 2 类群包含 7 份种质,以相似系数 0.87 为界,可分为 2 个亚类,第 1 亚类包含 4 份种质,其中宁国市方塘乡 3 份,宁国市青龙乡 1 份;第 2 亚类含有 3 份种质,其中 2 份来自浙江省(诸暨香榧),1 份来自安徽省宁国市方塘乡。

第 3 类群含有 37 份种质,以相似系数 0.91 为界,分为 4 个亚类。第 1 亚类包含 30 份种质,第 2 亚类仅含有 1 份种质(来自宣城市水东镇),第 3 亚类包含 5 份种质,全部来自宁国市青龙乡,第 4 亚类包含 1 份种质(来自宁国市青龙乡)。在相似系数 0.94 处,第 1 亚类可分为 5 小类,第 1 小类包含 8 份种质,其中 2 份种质来自宁国市,1 份种质来自宣城市,5 份种质来自黟县(5 份种质聚为一类,且圆榧类种质亲缘关系近,聚为一类);第 2 小类包含 4 份种质,3 份来自宣城市,1 份来自宁国市;第 3 小类包含 17 份种质,8 份来自宣城市,1 份来自浙江省(诸暨香榧),8 份来自黟县,其中来自黟县的多为圆榧类种质,且聚为一类;第 4 小类仅包含 1 份种质(来自宣城市溪口镇)。

3　讨论

本研究中所使用的 ISTR 分子标记是基于椰子 Ty1 – copia 逆转座子序列开发而来的[8,12],试验的目的在于探讨 ISTR 分子标记在榧树种质资源中的适用性及其用于研究榧树资源亲缘关系的可行性。本试验中 ISTR 多态性比例为 87.09%,多态性比例较高,且关于榧树逆转座子标记未见报道,使用通用引物较以特异性引物开发为前提的逆转座子标

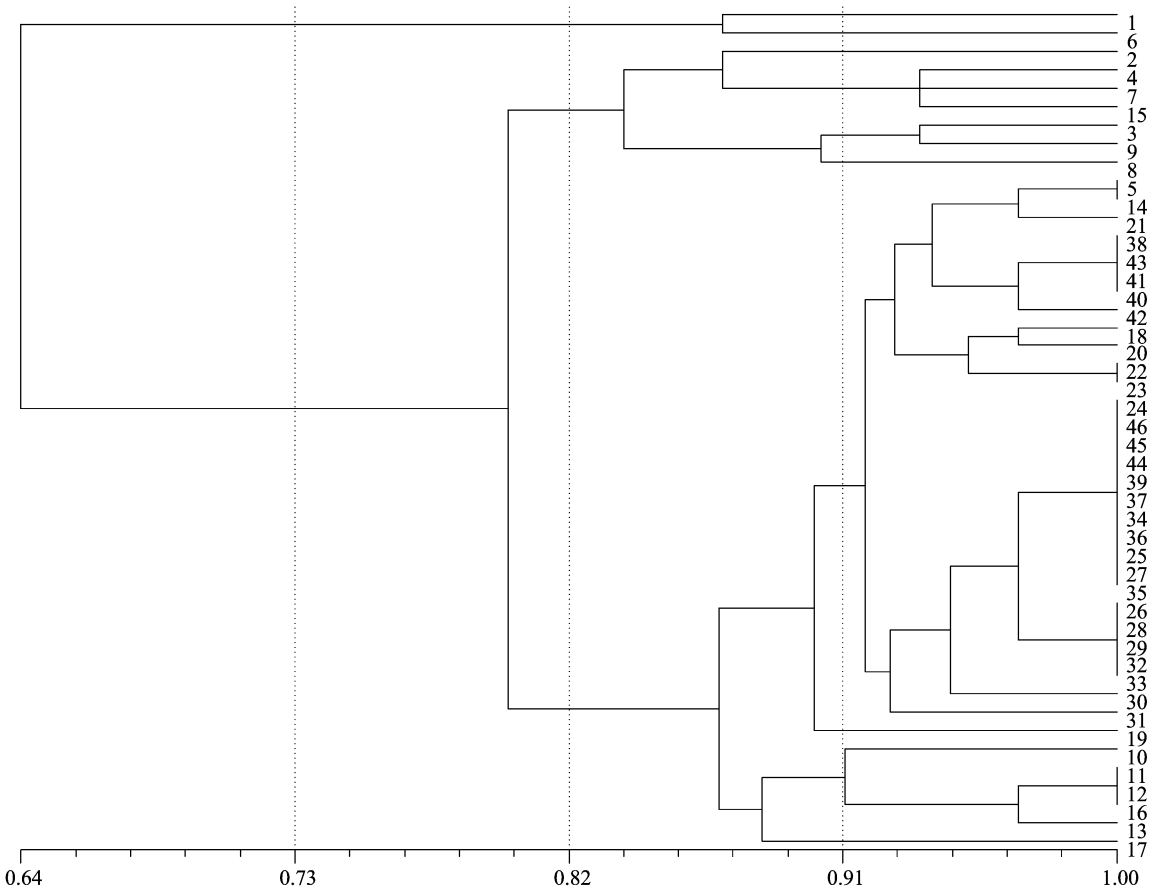


图2　46 份香榧种质 UPGMA 法聚类分析树状图

记成本低,因此 ISTR 是较便捷的逆转座子标记。

本试验结果显示,46 份榧树种质遗传相似系数为 0.548 4 ~1.000 0,榧树种质资源遗传多样性较为丰富。聚类分析结果显示第 1 类群全部来自宁国市方塘乡;第 2 类群包含 7 份种质,其中 5 份来自宁国市,2 份来自浙江省(诸暨香榧);46 份种质中的 37 份属于第 3 类群,基本包含了所有的采样地区,其中第 1 亚类包含 30 份种质,第 2 亚类仅含有 1 份种质(来自宣城市水东镇),第 3 亚类包含 5 份种质,全部来自宁国市青龙乡,第4 亚类包含 1 份种质(来自宁国市青龙乡)。第 1 亚类又分为 5 小类,第 1 小类包含 8 份种质,其中 2 份种质来自宁国市,1 份种质来自宣城市,5 份种质来自的黟县;第 2 小类包含 4 份种质,3 份来自宣城市,1 份来自宁国市;第 3 小类包含 17 份种质,8 份来自宣城市,1 份来自浙江省(诸暨香榧),8 份来自黟县,其中来自黟县的多为圆榧类种质,且聚为一类;第 4 小类仅包含 1 份种质(来自宣城市溪口镇)。由于安徽省榧树资源分布呈现地域性,在相对独立的环境中进化;同一地理来源的种质间基因交流频繁,从而使亲缘关系较近,遗传变异系数相对较低;遗传距离与地理距离具有一定的相关性,安徽省榧树资源中来自同一区域的多聚为小类,但聚为一类的榧树种质并非都来自同一地区,这可能与地区之间的引种有关,也可能与本试验所选用的 ISTR 引物数量有限相关。此外,遗传多样性水平受繁育方式影响[13],来自黟县的种质资源多为圆榧类,亲缘关系非常近,聚在一起,这可能与长期的实生播种繁殖方式有关。

本研究中所选的引物扩增出的多态性位点在供试材料间具有独特性,来自宁国市方塘乡的榧树种质资源遗传多样性较为丰富。利用 F8/B6 引物组合进行扩增时,17 号样本(雄株)在 500 bp 左右出现独特性扩增位点,与雌性榧树有明显区分,其特异性位点扩增作为雌雄性鉴定的依据有待于进一步研究。

本研究中 ISTR 产物使用高浓度的琼脂糖凝胶电泳检测手段获得较好的结果,表明高浓度琼脂糖凝胶电泳可用于检测 ISTR 产物,提高了试验效率[11]。试验中发现用高浓度的琼脂糖凝胶电泳检测部分引物扩增结果时,条带有密集现象;目前报道多采用的聚丙烯酰氨凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis,PAGE)检测方式具有分辨率高等优点。因此,今后应依据试验目的、遗传背景等方面选择 ISTR 产物检测方式。

安徽省榧树种质资源丰富,其中不乏新发现的优良株系[1],但野生榧树的低收益,使得农户疏于管理或改接为诸暨香榧,从而造成榧树种质资源的逐年减少,分析安徽省榧树种质的遗传多样性有助于了解其亲缘关系和从中筛选优良株系。本试验探讨 ISTR 标记在榧树种质鉴定和亲缘关系分析中应用的可行性,以期为今后开展遗传多样性评价、雌雄性别鉴定、种质鉴定和亲缘关系分析等研究提供新的研究手段,对榧树资源的保存利用具有重要的研究意义。

齐　帆,范　兴,陈　义,等. 基于 RNA – seq 数据发掘响应干旱的谷子 C2H2 型锌指蛋白基因[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):41 – 45.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2019.02.009

基于 RNA – seq 数据发掘响应干旱的谷子 C2H2 型锌指蛋白基因

齐　帆, 范　兴, 陈　义, 王晶慧, 许慧晶, 马芳芳
(山西农业大学农学院,山西太谷 030801)

摘要:C2H2 型锌指蛋白在植物响应逆境胁迫以及激素信号转导过程中起着重要作用,为了发掘响应干旱胁迫的谷子 C2H2 型锌指蛋白基因(*SiC2H2*),利用转录组测序技术构建谷子聚乙二醇(PEG)处理前后转录组文库,根据表达谱数据鉴定出 11 个 *SiC2H2* 差异表达基因,对其进行理化性质、启动子元件等部分生物信息学分析和进化树及基因结构分析。实时荧光定量逆转录 PCR(RT – PCR)验证结果表明,随机选取的 4 个基因在 PEG 胁迫前后的表达特点与表达谱数据基本一致。研究结果为后续进一步研究 C2H2 型锌指蛋白在谷子抗旱性中的作用以及谷子抗旱分子育种提供了理论依据。

关键词:谷子;C2H2 型锌指蛋白;干旱胁迫;差异表达基因
中图分类号: S515.01　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2019)02 – 0041 – 05

干旱是我国粮食生产的重要制约因素之一,且干旱的频率和程度日趋严重,因此选育抗旱品种已成为育种的重要目标。谷子[*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]属禾本科狗尾草属,具有耐旱、耐瘠薄、适应性强、水分利用率高等特点,在作物抗旱种质资源利用方面具有其独特的研究价值[1]。谷子全基因组测序的完成为研究谷子功能基因组提供了平台[2-3],发掘与鉴定谷子抗旱基因资源、探索谷子抗旱机制对于促进其基因资源的利用和抗旱育种有着极为重要的理论和实践意义。

锌指蛋白是植物转录调节子中最大的家族之一,具有指状结构且能结合锌离子[4],其中的 C2H2 型锌指蛋白具有一段高度保守的氨基酸特征序列 QALGGH,含有由大约 30 个氨基酸组成的锌指结构,该结构的保守序列为 $X_2CX_{2-4}CX_{12}$

收稿日期:2018 – 02 – 11
基金项目:国家自然科学基金(编号:31401396);地方高校国家级大学生创新创业训练计划(编号:201610113023);山西省青年科技研究基金(编号:201601D021125、2015021142);山西农大校基金(编号:2013YJ04、2014022、2014YZ2 – 5)。
作者简介:齐　帆(1996—),女,陕西宝鸡人,研究方向为制药工程。E – mail:1910511457@qq.com。
通信作者:马芳芳,博士,副教授,主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。Tel:(0354)6288344;E – mail:mff1984abc@163.com。

参考文献:

[1]俞飞飞,郭新峰,陆丽娟,等. 宁国市榧树种质资源调查及评价[C]//中国园艺学会 2015 年论文摘要集,2015:2620.
[2]梁淑云,丁之恩,胡文翠. 安徽香榧资源概况及栽培技术[J]. 经济林研究,2006,24(2):59 – 62.
[3]吴剑权. 黟县香榧资源与栽培技术研究[J]. 安徽农学通报,2013,19(14):71,85.
[4]俞飞飞,陆丽娟,周军永,等. 安徽省榧树种质资源调查及果实经济性状评价[C]//中国园艺学会 2017 年论文摘要集,2017:2500.
[5]吕玉兰. 黄山区香榧产业现状及发展对策[J]. 安徽农业科学,2014,42(20):6898 – 6899.
[6]胡大荣. 徽州区香榧产业发展现状及对策[J]. 安徽林业科技,2016,42(1/2):49 – 51.
[7]Demey J R,Gamez E,Molina S,et al. Comparative study of the discrin inating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2004,22:29 – 35.
[8]Rohde W. Inverse sequence – tagged repeat(ISTR) analysis,a novel and universal PCR – based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom.[J]. Journal of Genetic and Breeding,1996,50:249 – 261.
[9]Sensi E,Vignani R,Rohde W,et al. Characterization of genetic biodiversity witnin *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genetypes by AFLP and ISTR – DNA markers technology[J]. Vitis,1996,35:183 – 188.
[10]Tao N G,Wei J,Liu Y Z,et al. Copin – like retrotransposons in aprecocious mutant of trifoliate orange[*Poncirus trifoliata* (L.) Raf][J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology,2006,81(6):5.
[11]杜晓云,张梦思,罗正荣,等. ISTR 在部分柿属植物种质鉴定和亲缘关系分析中的应用[J]. 园艺学报,2009,36(4):481 – 486.
[12]Aga E,Bryngelsson T. Inverse sequence – tagged repeat(ISTR) analysis of genetic variability in forest coffee(*Coffea arabica* L.) from Ethiopia[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2006,53:721 – 728.
[13]Hamrick J L,Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B:Biological Sciences,1996,351:1291 – 1298.