

毛竹种质分子鉴别 SRAP、AFLP、ISSR 联合分析

郭起荣^{1,2}, 任立宁¹, 牟少华¹, 徐振国¹, 孙立方¹, 王青^{1,3}

(1. 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2. 江西农业大学 江西省竹子种质资源与利用重点实验室, 江西 南昌 330013; 3. 北京林业大学, 北京 100083)

摘要: 选择 10 份毛竹(*Phyllostachys edulis*) 种质, 突破以往单一分子鉴别的分析方法, 采用 AFLP、ISSR、SRAP 3 种标记数据联合进行判别分析, 结果显示: 联合鉴别分析可以有效提高种质鉴别率, 其效果顺序为 (AFLP + ISSR + SRAP) > (AFLP + SRAP) > (ISSR + SRAP) > (AFLP + ISSR); 单一鉴别的一致性顺序为 SRAP > AFLP > ISSR。探讨了毛竹种质-Q、油毛竹等种质的分子遗传特征。

关键词: 毛竹; 种质; AFLP; ISSR; SRAP; 联合鉴别

中图分类号: Q344⁺14 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0982-05

Joint Analysis of SRAP, AFLP, ISSR Molecular Identification for *Phyllostachys edulis* (Poaceae) Germplasm

GUO Qi-rong^{1,2}, REN Li-ning¹, MU shao-hua¹,
XU Zhen-guo¹, SUN Li-fang¹, WANG Qing^{1,3}

(1. International Centre for Bamboo and Rattan (ICBR), Beijing 100102, China; 2. The Key Lab. of Bamboo Germplasm and Utilization of Jiangxi Province, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330038, China; 3. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 10 accessions of different germplasms of moso bamboo (*Phyllostachys edulis* cv. *Epruinosa*, *Ph. edulis* cv. *Huamozhu*, *Ph. edulis* cv. *Heterocyclus*, *Ph. edulis* cv. *Pachyloen*, *Ph. edulis* cv. *Tubaeformis*, *Ph. edulis* cv. *Nabeshimana*, *Ph. edulis* cv. *Gimmet*, *Ph. edulis* cv. *Flexuosa* and 2 accessions of special moso genetic resources moso - M, moso - Q) and 2 outgroups (*Ph. kwangsiensis*, *Ph. reticulata*) are taken for the study: AFLP, ISSR, SRAP, (AFLP + SRAP), (ISSR + SRAP), (AFLP + ISSR), (AFLP + ISSR + SRAP), single-species and multi-joint identifications method are respectively used for the genetic similarity cluster analysis and principal coordinates analysis of genetic distance. Based on the comprehensive analysis of support and resolution, the order of combined identification result is: (AFLP + ISSR + SRAP) > (AFLP + SRAP) > (ISSR + SRAP) > (AFLP + ISSR), and the result of combined analysis is superior

收稿日期: 2010-09-30

基金项目: 科技部科技基础条件平台资助(2005DKA21003)

作者简介: 郭起荣(1968—), 男, 江西上犹人, 博士后, 教授, 博士生导师。1992年6月本科毕业于江西农业大学林学专业, 同年留校任教, 主要从事竹子种质、现代竹林经营研究。2003年博士毕业于中南林业科技大学, 2006年中国林业科学研究院生物学博士后流动工作站出站。主持完成国家自然科学基金课题、科技部农转化项目、国家科技基础条件平台项目、科技支撑项目专题等近10项; 在研多项。曾获得“江西青年学者”、江西省科技进步一等奖1项(竹林培育与经营利用 CAI 主持)、江西省科技进步三等奖1项。E-mail: QRGUO@icbr.ac.cn。

to the effect of a single identification. This study indicates that the genetic similarity coefficient range of the 10 bamboos in the test is 0.599 7-0.869 3, the genetic distance 0.203 8-0.676 4, the sequence homology 97.40% - 99.9%, the variation rate 0.0 ~ 2.06%. Tag information shows that *Ph. edulis* cv. *Epruinosa* and *Ph. edulis* cv. *Pachyloen* are of unique germplasm with special genetic basis. In terms of *Ph. kwangsiensis*, the results show that not only genetic diversity out sequence analysis on *Ph. edulis* germplasm, did not show symptoms of overseas groups.

Key words: *Phyllostachys edulis*; germplasm; SRAP; AFLP; ISSR; molecular distinction joint analysis

竹子无性繁育为主,如何对竹子种质进行遗传鉴别是种质保育面临的科学问题之一。分子标记等技术为生物种质鉴别提供了新的技术手段,丰富了经典的表型、生理、细胞鉴别的研究内容。随着竹子分子生物学技术研究的深入,发现依靠单一标记技术进行种质鉴别其支持率、分辨率有限,难以体现种质分子遗传特征的原本内涵,需要选用各自特点的更多种类的分子方法联合起来进行遗传鉴别,以便更加深刻地揭示每份(accession)种质的多维特征^[1-2]。

1 材料和方法

1.1 材料

所有供试材料均采集于国际竹藤网络中心安徽黄山太平基地种质资源保存库资源圃(表1)。

1.2 DNA的提取与检测

剪取各供试材料的幼嫩叶片,硅胶干燥,采用改良CTAB法提取DNA;用紫外分光光度计和质量分数为1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.3 扩增引物

采用国际竹藤网络中心国家林业局竹藤科学与技术重点实验室长期筛选出的多态性好的AFLP引物6对、SSR引物8个、SRAP引物15对作为扩增引物,对上述种质进行联合鉴别。

1.4 PCR反应体系及扩增程序

AFLP反应体系按北京鼎国AFLP试剂盒进行操作。扩增程序为:94℃预变性2min;第1轮扩增参数94℃变性30s,65℃退火30s,72℃延伸80s,以后每轮循环退火温度递减1℃,扩增10轮;接着按下列参数扩增23轮:94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸80s;最后,72℃延伸7min。

ISSR扩增反应体系参考孙志娟^[4]为20μL:1×buffer、*Taq*酶1.5U、 Mg^{2+} 2.5mmol/L、模板DNA80ng、dNTP0.15mmol/L、引物0.4μmol/L。扩增程序为:94℃预变性5min;94℃变30s,48℃退45s,72℃延伸90s,共40个循环;72℃延伸7min。

SRAP反应体系^[6]为50μL:20ng模板DNA,2.0mmol/L Mg^{2+} ,175μmol/L dNTPs,0.2μmol/L引物,1.5U *Taq* DNA聚合酶,5μL 10×buffer。扩增程序参考Li的方法^[5]为:94℃预变性5min;94℃变性1min,35℃复性1min,72℃延伸1min,5个循环;94℃变性1min,50℃复性1min,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min;4℃结束保存。

表1 供试材料

Tab.1 Materials

种质编号 Accession No.	种质名称 Germplasm name	所属物种学名 Lation Name
PY-1	毛竹-M	<i>Phyllostachys edulis</i>
PY-2	毛竹-Q	<i>Phyllostachys edulis</i>
PY-3	油毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Epruinosa</i>
PY-4	花毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Huamozhu</i>
PY-5	龟甲竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Heterocycla</i>
PY-6	厚壁毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Pachyloen</i>
PY-7	圣音竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Tubaeformis</i>
PY-8	绿皮花毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Nabeshimana</i>
PY-9	黄槽毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Gimmet</i>
PY-10	曲秆毛竹	<i>Phyllostachys edulis</i> cv. <i>Flexuosa</i>
PK	假毛竹	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i>
PB	桂竹	<i>Phyllostachys reticulata</i>

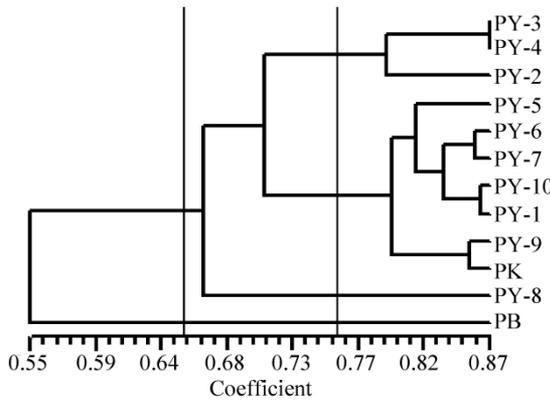


图 1 毛竹种质 AFLP、ISSR 联合鉴别

Fig. 1 AFLP ,ISSR dendrogram of genotypes based on percent agreement similarity

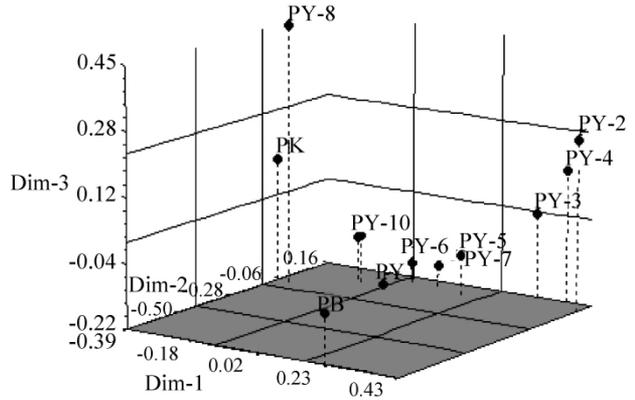


图 2 毛竹种质 AFLP、ISSR 标记的三维坐标

Fig. 2 The three - dimensional coordinate frame of AFLP ,ISSR cluster analysis on genotypes

1.5 数据处理与分析

将 AFLP、ISSR、SRAP 3 种鉴别的 0 - 1 矩阵数据分别或联合采用 NTSYSpc 2. 10 软件进行分析 ,得到种质联合鉴别聚类图和主坐标图 ,并进行一致性分析。

2 结果与分析

分别使用 AFLP、ISSR、SRAP 单种标记方法 ,对 12 份各异种质进行分子鉴别。可见 ,AFLP 的 6 对引物共扩增出 440 条带 ,平均每对引物扩增出 73 条带 ,其中多态性条带为 303 条 ,平均多态率为 68. 86% ; ISSR 的 8 个引物共扩增出 77 条带 ,平均每个引物扩增出 9. 63 条带 ,其中多态性条带为 64 条 ,平均多态率为 83. 12% ; SRAP 的 15 对引物共扩增出 214 条带 ,平均每对引物扩增出 14. 27 条带 ,其中多态性条带为 177 条 ,平均多态率为 82. 69% 。 AFLP 扩增多态率 (68. 86%) 低于师丽华等^[7]采用 RAPD 方法对 7 个毛竹栽培类型进行分子标记的多态率 (78. 28%) ,采用单个 ISSR 和单个 SRAP 标记的多态率高于师丽华等的研究结果。

2.1 AFLP 与 ISSR 联合鉴别分析 (AFLP + ISSR)

由图 1、图 2 可知 ,在 AFLP 与 ISSR 联合分析中 ,相似系数为 0. 75 时 ,可供试种质为 4 支 ,第 1 支有毛竹 - Q、油毛竹、花毛竹 ;第 2 支有毛竹 - Q、厚壁毛竹、圣音竹、绿皮花毛竹、黄槽毛竹、曲秆毛竹及外类群假毛竹 ;第 3 支有绿皮花毛竹 ;第 4 支是外类群桂竹 ,这一结果与 AFLP 单独分析的结果一致 ,比 ISSR 多 2 支。

由表 2 还可以看出 ,AFLP、ISSR 单标记与 (AFLP + ISSR) 联合分析的鉴别结果一致性指数分别为 0. 8、0. 3 ,可见 AFLP 在 (AFLP + ISSR) 联合分析结果中起主导作用。

表 2 鉴别一致性指数

Tab. 2 The table of consistency index

	AFLP	ISSR	SRAP	AFLP + ISSR	AFLP + SRAP	ISSR + SRAP	AFLP + ISSR + SRAP
AFLP	1						
ISSR	0. 3	1					
SRAP	0. 1	0. 1	1				
AFLP + ISSR	0. 8	0. 3	0. 1	1			
AFLP + SRAP	0. 1	0. 1	0. 2	0. 1	1		
ISSR + SRAP	0. 1	0. 2	0. 5	0. 1	0. 1	1	
AFLP + ISSR + SRAP	0. 1	0. 1	0. 3	0. 1	0. 5	0. 2	1

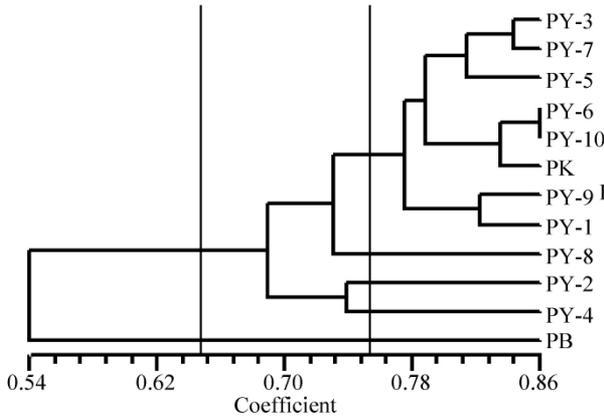


图 3 毛竹种质 AFLP、SRAP 联合鉴别
Fig. 3 AFLP, SRAP dendrogram of genotypes based on percent agreement similarity

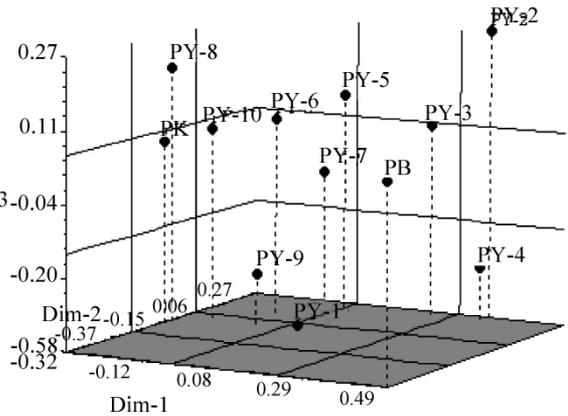


图 4 毛竹种质 AFLP、SRAP 标记的三维坐标
Fig. 4 The planar coordinate frame of AFLP, SRAP cluster analysis on genotypes

2.2 AFLP 与 SRAP 联合鉴别分析 (AFLP + SRAP)

由图 3 可知,在 AFLP 与 SRAP 联合分析中,相似系数为 0.75 时,可将供试种质分为 5 支,第 1 支有毛竹-Q、油毛竹、龟甲竹、厚壁毛竹、圣音竹、黄槽毛竹、曲秆毛竹及外类群假毛竹,第 2 支为绿皮花毛竹,第 3 支为毛竹-Q,第 4 支为花毛竹,第 5 支为外类群桂竹,这一联合分支结果比 AFLP 单独分支多 1 支,比 SRAP 多 2 支,这表明 AFLP 与 SRAP 联合分析后种质分辨率比单独分析时高。

由表 2 还可知, AFLP、SRAP 与 (AFLP + SRAP) 分析的结果一致性分别为 0.2、0.1, SRAP 在 (AFLP + ISSR) 联合分析结果起主要作用。

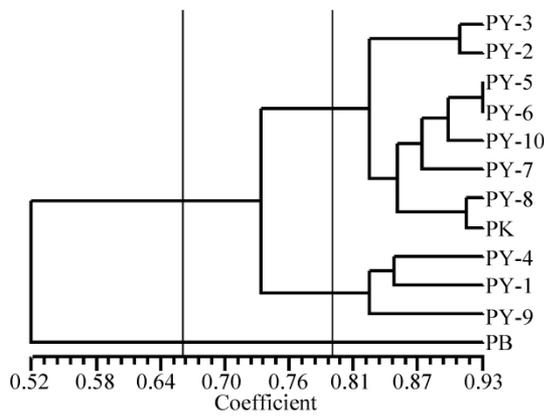


图 5 毛竹种质 ISSR 和 SRAP 联合鉴别
Fig. 5 ISSR and SRAP dendrogram of genotypes based on percent agreement similarity

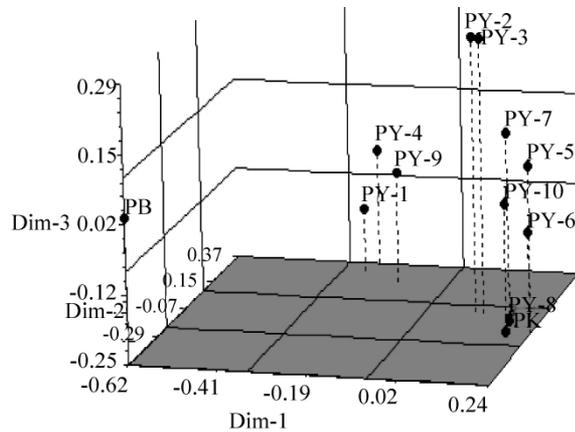


图 6 毛竹种质 ISSR、SRAP 标记的三维坐标
Fig. 6 The planar coordinate frame of ISSR, SRAP cluster analysis on genotypes

2.3 ISSR 与 SRAP 联合鉴别分析 (ISSR + SRAP)

由图 5 可知,在 ISSR 与 SRAP 联合分析中,当相似系数为 0.88 时,可将供试种质分为 8 支,第 1 支为毛竹-Q、油毛竹,第 2 支为龟甲竹、厚壁毛竹、曲秆毛竹,第 3 支为圣音竹,第 4 支为绿皮花毛竹及外类群假毛竹,第 5 支为花毛竹,第 6 支为毛竹-M,第 7 支为黄槽毛竹,第 8 支为外类群桂竹;ISSR、SRAP 单标记分析时,在相似系数为 0.88 时,分支数分别为 5 支、7 支,比联合分析少 3 支和 1 支,这表明 ISSR 与 SRAP 联合分析后种质分辨率比单独分析时高。

由表 2 可知,ISSR、SRAP 与 (ISSR + SRAP) 分析的结果一致性分别为 0.5、0.2, SRAP 在 (ISSR + ISSR) 联合分析结果中起主要作用。

2.4 AFLP、ISSR、SRAP 联合鉴别分析 (AFLP + ISSR + SRAP)

由图 7 可知,当相似系数为 0.85 时,在 AFLP、ISSR、SRAP 联合分析中,可将供试种质分为 11 支,在

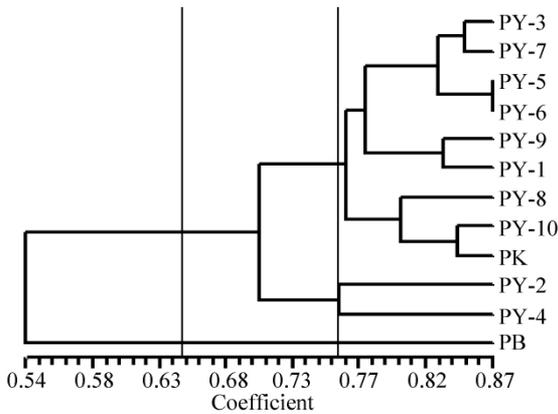


图 7 毛竹 AFLP、ISSR 及 SRAP 联合鉴别聚类

Fig. 7 AFLP, ISSR, SRAP dendrogram of genotypes based on percent agreement similarity

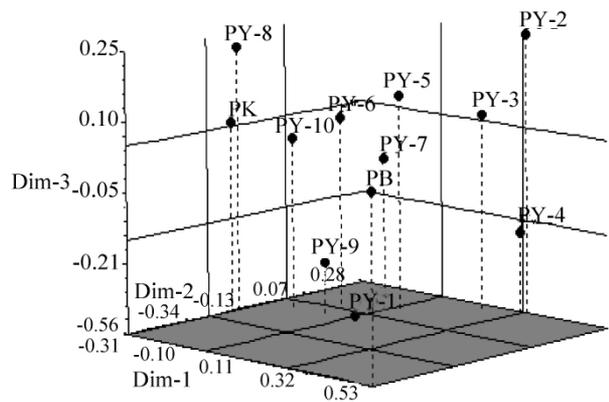


图 8 毛竹种质 AFLP、ISSR、SRAP 标记的三维坐标

Fig. 8 The planar coordinate frame of AFLP, ISSR, SRAP cluster analysis on genotypes

(AFLP + ISSR) 、(AFLP + SRAP) 、(ISSR + SRAP) 联合分析中 ,分支数分别为: 8 支、10 支和 7 支 ,这说明 AFLP、ISSR、SRAP 3 种联合鉴别分辨率比(AFLP + ISSR) 、(AFLP + SRAP) 、(ISSR + SRAP) 两种联合的鉴别高。

由表 2 ,可知(AFLP + ISSR) 、(AFLP + SRAP) 、(ISSR + SRAP) 与(AFLP + ISSR + SRAP) 鉴别分析结果一致性分别为 0. 1、0. 5、0. 2 ,(AFLP + SRAP) 在(AFLP + ISSR + SRAP) 联合分析结果起主要作用 ,(ISSR + SRAP) 次之 ,(AFLP + ISSR) 更次。

采用(AFLP + ISSR + SRAP) 3 种标记联合分析结果显示还显示 ,毛竹-Q 与毛竹-M 的遗传距离 0. 491 4 ,(AFLP + ISSR) 联合分析的遗传距离为 0. 437 2 ,(AFLP + SRAP) 联合分析的遗传距离为 0. 568 1 ,(ISSR + SRAP) 联合分析的遗传距离为 0. 385 5 , AFLP 分析的遗传距离为 0. 518 8 , ISSR 分析的遗传距离为 0. 125 8 , SRAP 分析的遗传距离为 0. 590 0 表明种质“毛竹-Q”是一份具有特定遗传背景的特异种质 ,毛竹-Q 也表现其表型差异 ,待正式命名。(AFLP + ISSR + SRAP) 联合标记分析还发现 ,毛竹-Q 与油毛竹的遗传相似性最大(相似系数为 0. 820 8) ,与绿皮花毛竹的遗传相似性最小(相似系数为 0. 610 5) 。

在丁雨龙^[3]进行刚竹属系统研究时 ,发现油毛竹竹秆因光滑无毛 ,暂列为毛竹的种下类型。根据 3 种标记联合分析的结果 ,油毛竹与毛竹-M 的遗传相似系数为 0. 748 0 与圣音竹的遗传相似系数(0. 849 1) 最大 ,与绿皮花毛竹的遗传相似性最小(相似系数为 0. 676 5) ,油毛竹是一份具有一定遗传背景的特殊种质。

本研究中使用的 1 份种质桂竹均表现出“外类群”性质 ,而 1 份“假毛竹”种质无论从 3 种分子标记的 7 种单种、联合标记分析中 ,还是从 2 种基因序列检测(另文发) ,结果都显示其与毛竹种质聚合在一起 ,没有表现出“外类群”的特征。假毛竹为 1980 年发表的经济竹种 ,分布广西、湖南等地。其因被疏生已落粗硬毛 ,斑点小 ,箨叶极为发育 ,长达 30 cm ,叶片带形 ,较长 ,与毛竹有显著区别。初看起来 ,有些近似 ,但并无亲缘关系^[8]。从本实验结果来看 ,假毛竹在 ITS 中与毛竹-Q、油毛竹、花毛竹、龟甲竹、绿皮花毛竹、厚壁毛竹、黄槽毛竹聚为第 1 支 ,支持率为 69% ,其原因有待进一步研究。

3 结论与讨论

(1) 使用 SRAP 、AFLP、ISSR 等 3 种或 2 种分子标记方法对毛竹种质开展联合鉴别 ,提高了鉴别结果一致性 ,鉴别质量优于单一标记 ,且(AFLP + ISSR + SRAP) > (AFLP + SRAP) > (AFLP + ISSR) > (ISSR + SRAP) ,单一分子标记鉴别结果的一致性顺序为 SRAP > AFLP > ISSR。

(2) 采用(AFLP + ISSR + SRAP) 联合分析表明种质“毛竹-Q”是一份具有特定遗传背景的特异种质 ,其表型也婀娜多姿;毛竹-Q 与油毛竹的遗传相似性最大(相似系数为 0. 820 8) ,与绿皮花毛竹的遗传相似性最小(相似系数为 0. 610 5) 。油毛竹与毛竹-M 的遗传相似系数为 0. 748 0 ,与圣音竹的遗传

(下转第 991 页)

- [6] Liu L, Zhou Y, Zhou G, et al. Identification of early senescence – associated genes in rice flag leaves [J]. *Plant Mol Biol*, 2008 67: 37 – 55.
- [7] 林拥军 陈浩 曹应龙 等. 根癌农杆菌介导的牡丹江 8 号高效转基因系统的建立 [J]. *作物学报* 2002 28(3): 294 – 300.
- [8] Liu K D, Wang J, Li H B, et al. A genome – wide analysis of wide – compatibility in rice and the precise location of the S5 locus in the molecular map [J]. *Theor Appl Genet*, 1997 95: 809 – 814.
- [9] Ross E J, Stone J M, Elowaky C G, et al. Activation of the *Oryza sativa* non – symbiotic haemoglobin – 2 promoter by the cytokinin – regulated transcription factor, ARR1 [J]. *J Exp Bot* 2004 55(403): 1721 – 1731.
- [10] Abe H, Yamaguchi – Shinozaki K, Urao T, et al. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid – regulated gene expression [J]. *The Plant Cell*, 1997 9: 1859 – 1868.
- [11] Abe H, Urao T, Ito T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell* 2003 15(1): 63 – 78.
- [12] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol* 2004 134(4): 1500 – 1513.
- [13] Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression [J]. *J Biol Chem* 2004 279: 55355 – 55361.
- [14] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP Proteins gather at ACGT elements [J]. *Fesb J*, 1994 8(2): 192 – 200.

(上接第 986 页)

相似系数(0.849 1) 最大, 与绿皮花毛竹的遗传相似性最小(相似系数为 0.676 5) 油毛竹是一份具有一定遗传背景的特殊种质。假毛竹在聚类分析中未成为“外类群”需要进一步研究。

最新公布的第 7 次全国森林资源清查资料显示, 我国现有毛竹林面积 386.83 万 hm^2 , 是我国特有、分布和栽培面积最大的核心经济竹种, 在长期的自然变异、生产经营中产生了很多类型, 具有很丰富的遗传变异^[3, 8-13], 国内宜尽早开展系统的毛竹遗传格局、种质收集、种质保育工作。基于毛竹种质分子序列测定数据的联合分析有待另文续以。

参考文献:

- [1] 卢启泉. 四类平菇种质资源的分子标记分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [2] 应正河. RAPD、SRAP 和 ISSR 标记在香菇种植资源的应用及其 SCAR 标记的建立 [D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- [3] 丁雨龙. 刚竹属 (*Phyllostachys*) 系统分类的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 1998.
- [4] 孙志娟, 项艳, 汪结明, 等. 刚竹 ISSR 反应体系的正交优化 [J]. *竹子研究汇刊* 2007 26(4): 17 – 21.
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence – related amplified polymorphism(SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet* 2001 103: 455 – 461.
- [6] 任立宁, 郭起荣, 何高峰, 等. 竹子 SRAP – PCR 体系的建立与优化 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2010(4): 56 – 60, 79.
- [7] 师丽华, 杨光耀, 林新春, 等. 毛竹种下等级的 RAPD 研究 [J]. *南京林业大学学报* 2002 5(3): 65 – 68.
- [8] 赵起僧, 朱政德. 中国竹亚科一些属种的整理 [J]. *植物分类学报*. 1980 2(18): 20 – 36.
- [9] 魏瑜. 毛竹等 36 种竹类植物的 RAPD 分析 [D]. 福州: 福建师范大学学报, 2005.
- [10] 张守锋. 毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 遗传多样性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [11] 阮晓赛. 毛竹种源及栽培变种遗传变异的 AFLP 和 ISSR 分析 [D]. 临安: 浙江林学院, 2008.
- [12] 廖国华. 毛竹黄、白笋个体的 RAPD 指纹图谱分析 [J]. *福建农业学报*, 2003(01).
- [13] 郭小勤, 李犇, 阮晓赛, 等. 利用 ACGM 分子标记研究 10 个毛竹不同栽培变种的遗传多样性 [J]. *林业科学* 2009 (4): 28 – 32.