

基于ISSR技术研究诺丽种质资源的亲缘关系

吴田^a, 蓝增全^{b*}

(西南林业大学, a. 园林学院; b. 环境科学与工程学院, 昆明 650224)

摘要: 为探讨我国诺丽(*Morinda citrifolia*)种质资源的亲缘关系,采用 ISSR 技术对诺丽种质资源的遗传关系进行分析。结果表明, 10 条 ISSR 引物对 13 份诺丽种质资源共扩增出 183 条带,其中多态性条带有 159 条,占 86.9%。13 份诺丽种质的遗传相似系数为 0.464~0.784。聚类分析将 13 份诺丽种质资源聚为两类,其中诺丽小黑种单独聚为一类,与其他 12 份诺丽种质资源的亲缘关系较远。虽然按照外部形态特征不能将所有诺丽种质完全区分,但具有相同特征的多数种质还是聚在同一类或亚类中。

关键词: 诺丽; ISSR; 形态特征; 遗传多样性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2014.06.010

Genetic Relationship of *Morinda citrifolia* Germplasms by ISSR

WU Tian^a, LAN Zeng-quan^{b*}

(a. Landscape Architecture College; b. Environment Science and Engineering College, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: In order to understand the genetic relationship of *Morinda citrifolia* (noni), the DNA fingerprints of 13 noni germplasm resources were studied by ISSR markers. The results showed that ten ISSR primers could amplify 183 bands, of which 159 bands were polymorphic, accounting for 86.9%. The genetic similarity coefficients of 13 noni germplasm resources ranged from 0.464 to 0.784. Cluster analysis showed that 13 noni germplasm resources could be divided into two clads, in which Small fruit as a single group had distant relation with other germplasm resources. Although all noni germplasm resources could not completely separated according external morphological characteristics, the most with the same characteristics could be clustered into the same group or sub-group.

Key words: *Morinda citrifolia*; ISSR; Morphological characteristics; Genetic diversity

诺丽(*Morinda citrifolia* Linn.)为茜草科(Rubiaceae)热带常绿多年生阔叶灌木或小乔木^[1]。诺丽果是一种天然水果,营养丰富,几乎包含了所有对人体生长所需的营养成分,除了可以直接食用或加工后食用外,还具有预防和治疗疾病的功效^[2],诺丽的根、茎、叶、树皮、花、果实、种子都可以入药^[3-4]。诺丽多生长于赤道带国家,以南太平洋群岛国为主,在夏威夷、印度、印尼、泰国、马来西亚及中南美洲等也

有分布^[5-6]。在我国,诺丽可以生长在海南岛、西沙群岛和台湾岛等,近几年,海南、云南等省已开始规模种植。

随着分子生物学的发展,分子标记技术已被广泛应用于作物遗传研究。ISSR (Inter-simple sequence repeats)标记是采用 17~22 bp 的重复锚定引物扩增重复序列之间的片段,具有操作简单、重复性好、多态性丰富等特点^[7]。且一套 ISSR 引物可在多种

收稿日期: 2014-03-10 接受日期: 2014-04-28

基金项目: 国家林业局 948 项目(2011-4-45)资助

作者简介: 吴田(1980~),女,博士,副教授,研究方向为植物分子生物学。E-mail: 461257271@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 2351417655@qq.com

作物中通用,利用率高,在遗传关系研究方面的应用前景更广阔^[8]。ISSR技术已应用于水稻(*Oryza sativa*)^[9-10]、甜瓜(*Cucumis melo*)^[11]、地黄(*Rehmannia glutinosa*)^[12]、黄麻(*Corchorus capsularis*)^[13]、杜鹃红山茶(*Camellia changii*)^[14]、野牡丹(*Melastoma candidum*)^[15]等植物的种质资源鉴定和亲缘关系分析。为进一步开发利用诺丽的种质资源,本文采用ISSR技术分析诺丽种质资源的亲缘关系,为后续开展诺丽种质资源的遗传多样性研究,构建遗传连锁图谱等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试诺丽(*Morinda citrifolia* Linn.)种质材料共13份(表1),按照采集地或来源地的首字母大写或者种质的特征命名。INA-1的原产地为印度尼西亚,US-1、US-A、US-B、US-C、US-D的原产地为美国夏威夷,已经引种栽培在云南省西双版纳州热带作物研究所内。YJ采自云南省元江县屏边,可能的原产地为海南省。其余6份种质材料采自海南省儋州,其中Small fruit在海南当地人称为诺丽小黑种,并认为是海南岛原产植物。热带作物研究所位于勐腊县勐仑镇,勐腊县地处云南省最南端,地处北回归线以南,属北热带湿润季风气候,夏无酷热,冬无严寒,旱雨两季分明,年平均温度为

21℃,年降雨量1700 mm以上;儋州处于东亚大陆季风气候的南缘,属热带湿润季风气候,夏无酷暑,冬无严寒,阳光充足,雨量充沛,常年平均气温为23.5℃;屏边属元江县炎热地区,常年不结冰,年平均气温20℃~21℃,年平均降雨700~1200 mm。分别于2010年3月采集13份种质材料的新鲜嫩叶片,放入冰盒中带回实验室,于-80℃冰箱内保存备用。

1.2 主要试剂

β-巯基乙醇、琼脂糖、矿物油、CTAB、75%乙醇等购于昆明鼎国生物有限公司。Taq DNA聚合酶、Buffer(含MgCl₂)、dNTP等购于上海TaKaRa生物有限公司。ISSR引物由上海生物工程有限公司合成。

1.3 基因组DNA的提取与检测

诺丽叶片基因组DNA提取采用改良的CTAB法^[16]。提取后的DNA用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,并用微量分光光度计检测,计算OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀及浓度。

1.4 ISSR引物的筛选及PCR扩增

从加拿大哥伦比亚大学设计的100个ISSR通用引物中随机选出22个引物(表2)。PCR反应体系、PCR反应程序、PCR产物的电泳分离及成像均参

表1 诺丽供试材料

Table 1 Materials of *Morinda citrifolia* tested

材料 Material	采集地 Location	来源 Origin	生长状态 Growth state	叶形 Leaf shape	果实大小 Fruit size
HN-R	海南 Hainan	未知 Unkown	茂密 Lush	卵形 Ovate	中等 Medium
HN-M	海南 Hainan	未知 Unkown	稀疏 Sparse	卵形 Ovate	中等 Medium
HN-H	海南 Hainan	未知 Unkown	茂密 Lush	椭圆形 Oblong	中等 Medium
HN-ZZ	海南 Hainan	未知 Unkown	茂密 Lush	卵形 Ovate	中等 Medium
HN-I	海南 Hainan	可能是海南 Probably in Hainan	稀疏 Sparse	椭圆形 Oblong	小 Small
Small fruit	海南 Hainan	可能是海南 Probably in Hainan	稀疏 Sparse	椭圆形 Oblong	小 Small
YJ	云南 Yunnan	可能是海南 Probably in Hainan	稀疏 Sparse	披针形 Lanceolate	中等 Medium
INA-1	云南 Yunnan	印度尼西亚 Indonesia	茂密 Lush	披针形 Lanceolate	大 Large
US-1	云南 Yunnan	美国 US	茂密 Lush	卵形 Ovate	大 Large
US-A	云南 Yunnan	美国 US	茂密 Lush	卵形 Ovate	大 Large
US-B	云南 Yunnan	美国 US	茂密 Lush	卵形 Ovate	大 Large
US-C	云南 Yunnan	美国 US	茂密 Lush	卵形 Ovate	大 Large
US-D	云南 Yunnan	美国 US	茂密 Lush	卵形 Ovate	大 Large

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
814	CTCTCTCTCTCTCTA	846	CACACACACACACART
815	CTCTCTCTCTCTCTG	847	CACACACACACACARC
825	ACACACACACACACT	848	CACACACACACACARG
827	ACACACACACACACG	850	GTGTGTGTGTGTGTGYC
834	AGAGAGAGAGAGAGYT	854	TCTCTCTCTCTCTCRG
835	AGAGAGAGAGAGAGYC	855	ACACACACACACACYT
836	AGAGAGAGAGAGAGYA	856	ACACACACACACACYA
840	GAGAGAGAGAGAGAYT	857	ACACACACACACACYG
841	GAGAGAGAGAGAGAYC	858	TGTGTGTGTGTGTGRT
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC
845	CTC TCTCTCTCTCTRG	900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA

照吴田等^[17]的方法。

1.5 数据统计分析

根据电泳条带的有无统计数据,在相同迁移位置,有带记为1,无带记为0。计算诺丽种质的多态性:多态性(%)=(总带数-共有带数)/总带数×100%。

1.6 聚类分析

采用NTsys 2.1e软件对诺丽种质进行非加权组平均法(Unweighted Pair Group Method Analysis, UPGMA)聚类分析,计算遗传相似系数,构建树状图。

2 结果和分析

2.1 诺丽基因组DNA的提取

提取的诺丽种质叶片基因组DNA经电泳检测,可见DNA主带清晰明亮,条带整齐,无拖带现象。经超微量分光光度计检测,诺丽基因组DNA的 OD_{260}/OD_{280} 为1.71~1.89, OD_{260}/OD_{230} 为1.96~2.14,表明所提取的总DNA纯度好,可以满足后续ISSR-PCR的要求。

2.2 ISSR引物的筛选

以诺丽HN-M基因组DNA为模板,对22条ISSR引物进行筛选,结果筛选出10条能扩增出条带清晰、重复性好、多态性高的引物,分别为818、825、827、846、847、848、855、856、857、858(图1)。

2.3 诺丽种质的ISSR多态性分析

利用筛选出的10个引物,分别对13份诺丽种质的DNA进行ISSR-PCR扩增。从图2、3可见,扩增出的条带均清晰,易于读带,扩增的条带大部分集中在250~2000 bp,共扩增出183条DNA条带,其中多态性条带159条,平均多态性百分率为86.9%(表3)。

2.4 诺丽种质间的遗传相似系数分析

对13份诺丽种质所产生的159条多态性条带进行统计分析,获得了他们的遗传相似系数矩阵(表4)。各种质间的遗传相似系数为0.464~0.784,平均为0.648。采自海南的6份诺丽种质的遗传相似系数为0.562~0.752,除小黑种外,其余种质间的均大于0.6。来源于美国的5份诺丽种质的遗传相似系数为0.575~0.784,变化范围较采自海南的种质要大。除US-C与US-B的遗传相似系数最小外,其余种质间的遗传相似系数均大于0.6,且有6种对的大于0.7,遗传距离小表明亲缘关系较近。

2.5 诺丽种质间的聚类分析

采用UPGMA法构建了13份诺丽种质的遗传关系聚类图(图4)。结果表明,13份种质明显地聚为两类,第I类包含12份种质,包括两个亚类,第I亚类有10份诺丽种质,分成两个组,组I包括采自海南的HN-R和HN-M,他们的叶均为卵形、果实中等大小,不同之处仅在于HN-R的植株生长茂密,HN-M生长稀疏;组II有8份诺丽种质,又

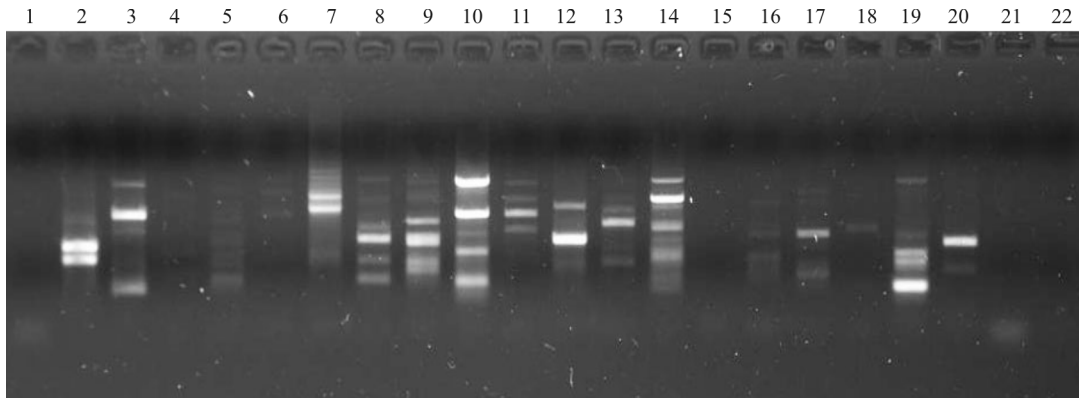


图1 诺丽 HN-M 基因组 DNA 的 PCR 扩增。1~22 分别代表引物 900、827、846、840、836、834、858、856、855、825、814、850、848、847、845、844、841、835、857、854、895、815。

Fig. 1 PCR amplification of *Morinda citrifolia* 'HN-M'. 1~22 are primers 900, 827, 846, 840, 836, 834, 858, 856, 855, 825, 814, 850, 848, 847, 845, 844, 841, 835, 857, 854, 895 and 815, respectively.

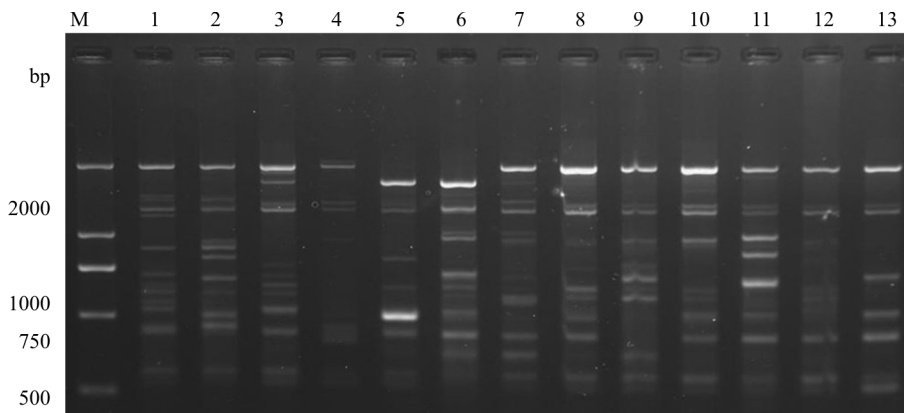


图2 引物 847 对诺丽基因组 DNA 的扩增。M: 标准分子量；1~13 分别代表诺丽 US-D、US-C、US-B、US-A、INA-1、US-1、HN-1、Small fruit、HN-ZZ、YJ、HN-H、HN-M、HN-R。

Fig. 2 Amplification of *Morinda citrifolia* by primer 847. M: Standard marker DL 2000; 1~13 are *Morinda citrifolia* US-D, US-C, US-B, US-A, INA-1, US-1, HN-1, Small fruit, HN-ZZ, YJ, HN-H, HN-M and HN-R, respectively.

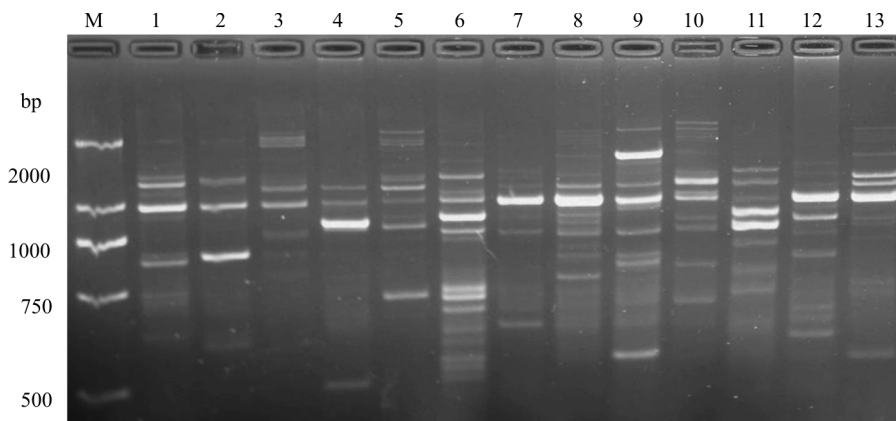


图3 引物 848 对诺丽基因组 DNA 的扩增。M: 标准分子量；1~13 分别代表诺丽 US-D、US-C、US-B、US-A、INA-1、US-1、HN-1、Small fruit、HN-ZZ、YJ、HN-H、HN-M、HN-R。

Fig. 3 Amplification of *Morinda citrifolia* by primer 848. M: Standard marker DL 2000; 1~13 are *Morinda citrifolia* US-D, US-C, US-B, US-A, INA-1, US-1, HN-1, Small fruit, HN-ZZ, YJ, HN-H, HN-M and HN-R, respectively.

表 3 诺丽 ISSR 标记的多态性分析

Table 3 Polymorphic analysis of *Morinda citrifolia* by ISSR

引物 Primer	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	%
818	15	12	80.0
825	15	12	80.0
827	20	15	75.0
846	11	9	81.8
847	26	22	84.6
848	28	27	96.4
855	21	19	90.5
856	15	13	86.7
857	20	18	90.0
858	12	12	100.0
合计 Total	183	159	86.9

表 4 13 个诺丽种质的遗传相似系数矩阵

Table 4 Genetic similarity matrix of 13 germplasm of *Morinda citrifolia*

	HN-R	HN-M	HN-H	YJ	HN-ZZ	Small fruit	HN-1	US-1	INA-1	US-A	US-B	US-C	US-D
HN-R	1.000												
HN-M	0.752	1.000											
HN-H	0.634	0.634	1.000										
YJ	0.588	0.627	0.562	1.000									
HN-ZZ	0.627	0.654	0.680	0.582	1.000								
Small fruit	0.562	0.588	0.575	0.464	0.621	1.000							
HN-1	0.686	0.699	0.686	0.706	0.680	0.575	1.000						
US-1	0.627	0.654	0.732	0.582	0.673	0.490	0.719	1.000					
INA-1	0.654	0.641	0.653	0.582	0.556	0.503	0.732	0.712	1.000				
US-A	0.686	0.686	0.699	0.641	0.706	0.575	0.765	0.784	0.719	1.000			
US-B	0.582	0.621	0.647	0.549	0.680	0.549	0.660	0.719	0.549	0.712	1.000		
US-C	0.654	0.667	0.654	0.725	0.621	0.516	0.732	0.647	0.660	0.745	0.575	1.000	
US-D	0.634	0.686	0.660	0.614	0.758	0.614	0.686	0.732	0.654	0.739	0.686	0.641	1.000

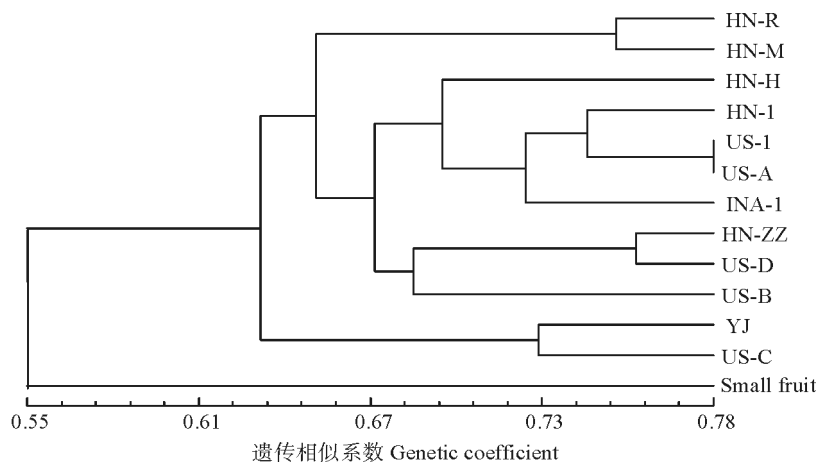


图 4 诺丽种质的遗传关系聚类图

Fig. 4 Dendrogram of genetic relationships of *Morinda citrifolia*

分为两个小组,多数种质具有植株生长茂密、叶椭圆形至卵形、果实较大等特征。第Ⅱ亚类包含采自云南的 YJ 和来源于美国的 US-C 两个种质,前者植株生长稀疏、叶披针形、果实中等,后者植株生长茂密、叶卵形、果实大,它们在这三个特征上都有差异。第Ⅱ类仅有采自海南的 Small fruit,单独聚为一类,其植株生长稀疏、叶椭圆形、果实小。

3 讨论

一般情况下,种质之间的地理距离远,生活在不同的栖息地,彼此不能相遇,阻碍了生物的自由迁移、交配、基因漂流,会造成基因流动的减少^[18];且受到太阳辐射、温度、水分、土壤、风、火等的影响,可以预料地理隔离会减少遗传相似性^[19-20]。采自海南的 HN-R、HN-M 聚在同 1 组,均具有叶卵形、果实中等的特征;而来源于美国的 US-1、US-A、US-B、US-D 这 4 份种质间的遗传相似系数较小,具有植株生长茂密、叶卵形、果实大的特征,但这 4 份种质处于不同的分支上。这说明种质的生境不一样,也会存在一定的地理隔离。

但是对诺丽种质而言,地理隔离并不一定会产生遗传变异。来源于美国的 5 份诺丽种质虽然具有相同的外部形态特征,但 US-C 与其余 4 份美国种质的亲缘关系相对较远,存在一定的变异。US-C 反而和外部形态特征不同的 YJ 种质亲缘关系最近,他们聚为一个亚类。采自海南的 6 份诺丽种质在外部形态上不尽相同,小黑种的变异较大,单独聚为一类,而其余 5 份海南种质的变异程度较小。

物种的遗传变异愈丰富,它们对环境的适应性也愈大。遗传多样性的降低会降低物种对于生态和进化的适应能力,而栽培植物较易流失遗传多样性^[21]。本研究中诺丽具有较高的遗传多样性,以本研究 ISSR 标记的聚类结果为依据,今后进行育种时宜选择亲缘关系较远的种质作为亲本进行杂交,增加遗传变异,如果实小的诺丽种质小黑种与其余种质亲缘关系都比较远,对需要获得果实小的目的基因来说,小黑种是比较合适的选择。

参考文献

- [1] Xing Y W, Fu M X, Li C W, et al. The seeds structure and germination test of *Morinda citrifolia* Linn. [J]. Nat Sci J Hainan Univ, 2007, 25(2): 156-162.
- [2] Wang M Y, West B J, Jensen C J, et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in noni research [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1127-1141.
- [3] McClatchey W. From Polynesian healers to health food stores: Changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) [J]. Integr Cancer Ther, 2002, 1(2): 110-120.
- [4] Wang M Y, Su C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni) [J]. Ann N Y Acad Sci, 2001(952): 161-168.
- [5] Dixon A R, McMillen H, Etkin N L. Ferment this: The transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) [J]. Econ Bot, 1999, 53(1): 51-68.
- [6] Hirazumi A, Furusawa E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity [J]. Phytother Res, 1999, 13(5): 380-387.
- [7] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98(1): 107-112.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [9] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and finger printing in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98(5): 780-792.
- [10] Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar R R, et al. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 5836-5841.
- [11] Liu W B, Song M, Liu F Z, et al. Assessment of genetic diversity of melon (*Cucumis melo*) germplasm based on RAPD and ISSR [J]. J Agri Biotechn, 2002, 10(3): 231-236.
- [12] 刘万勃, 宋明, 刘富中, 等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 231-236.
- [13] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs [J]. Hereditas, 2004, 26(6): 922-928.
- [14] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 922-928.
- [13] Qi J M, Zhou D X, Wu W R, et al. A comparison between RAPD and ISSR technology in detection of genetic diversity of jute [J]. Sci Agri Sin, 2004, 37(12): 2006-2011.
- [14] 祁建民, 周东新, 吴为人, 等. RAPD 和 ISSR 标记检测黄麻属遗传多样性的比较研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2006-2011.
- [14] Luo X Y, Zhuang X Y, Yang Y S. Genetic diversity of *Camellia*

- changii* Ye (Theaceae) using ISSR markers [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2007, 15(2): 93–100.
- 罗晓莹, 庄雪影, 杨跃生. 杜鹃红山茶遗传多样性的ISSR分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15(2): 93–100.
- [15] Zheng T, Chen Z D, Lin X X, et al. ISSR analysis of *Melastoma* germplasm in Fujian Province [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2013, 21(5): 406–413.
- 郑涛, 陈振东, 林秀香, 等. 福建省野牡丹属种质资源的ISSR分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2013, 21(5): 406–413.
- [16] Wu T, Lan Z Q, Li Q H. Isolation of genomic DNA in *Morinda citrifolia* Linn. and establishment of its ISSR-PCR reaction system [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2010, 38(17): 8859–8860.
- 吴田, 蓝增全, 李青红. 诺丽(*Morinda citrifolia* Linn.)叶片DNA的提取及ISSR-PCR反应体系的建立 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(17): 8859–8860.
- [17] Wu T, Shen X J, Li F Y, et al. ISSR analysis between Shuangjiang ancient tea trees and Yunnan big-leaf tea trees [J]. *Nat Sci J CS Univ For Techn*, 2012, 32(3): 136–140.
- 吴田, 沈晓进, 李法营, 等. 双江古茶树与云南大叶种茶群体品种间的ISSR分析 [J]. *中南林业科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(3): 136–140.
- [18] Paulo J E. Isozyme analysis revealed that the Portuguese mandarin ‘Carvalhais’ originated as a single clone [J]. *Sci Hort*, 1999, 82(1/2): 145–152.
- [19] Wang Z R. Allozyme analysis in studies of plant genetic diversity and systematics [J]. *Biodiv Sci*, 1994, 2(1): 38–43.
- 王中仁. 植物遗传多样性和系统学研究中的等位酶分析 [J]. *生物多样性*, 1994, 2(1): 38–43.
- [20] He J S, Li Z Z, Huang H W. Allozymic genetic diversity in *Manglietia patungensis*, an endangered species, and its conservation strategies [J]. *Biodiv Sci*, 2005, 13(1): 27–35.
- 何敬胜, 李作洲, 黄宏文. 濒危物种巴东木莲的等位酶遗传多样性及其保护策略 [J]. *生物多样性*, 2005, 13(1): 27–35.
- [21] Wang L. ISSR analysis of genetic diversity of the traditional Chinese medicinal plant *Ligusticum chuansiong* Hort. [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007: 12–15.
- 王岚. 用ISSR分子标记研究川产道地药用植物川芎的遗传多样性 [D]. 成都: 四川大学, 2007: 12–15.