

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.04.034

极危物种——南川木波罗遗传多样性 ISSR 分析

胡连清¹, 王清明¹, 丁显平^{1,2}, 谢依婷¹, 张 顺¹, 包善飞², 陈祖翼^{1,2}

(1. 四川大学生命科学学院, 特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 成都 610064;

2. 重庆市南川生物技术研究院, 南川 408400)

摘 要: 本研究利用 ISSR-PCR 分子标记技术分析研究了重庆市七个地区野生生长的 46 株南川木波罗 (*Artocarpus nanchuanensis*) 样品的遗传多样性. 利用筛选出的 12 条 UBC 引物共扩增出了 117 条 DNA 片段, 其中多态性片段为 113 条, 多态条带百分率为 96.58%. NTSYS~pc2.1 软件分析表明: 七个地区南川木波罗之间的遗传相似性介于 0.062~0.989 之间, 并用 UPGMA 法构建了系统树. 结果表明该市野生生长的南川木波罗既有相同的遗传背景, 又存在较明显的差异. 46 份材料划分为 4 类, 聚类基本符合地理来源相近的材料聚为一类, 呈现出一定的地域性分布规律.

关键词: 南川木波罗; ISSR; 遗传多样性; 遗传相似系数; 遗传距离

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)04-0865-08

ISSR analysis of the genetic diversity of *Artocarpus nanchuanensis*, a critically endangered species, in Nanchuan District, Chongqing

HU Lian-Qing¹, WANG Qing-Ming¹, DING Xian-Ping^{1,2}, XIE Yi-Ting¹,
ZHANG Shun¹, BAO Shan-Fei², CHEN Zu-Yi^{1,2}

(1. College of Life Science Sichuan University, Bio-resource Research and Utilization Joint Key Laboratory of Sichuan-Chongqing, Chengdu 610064, China; 2. Biotechnology academy of Nanchuan, Nanchuan 408400, China)

Abstract: Genetic diversity of 46 strains wild *Artocarpus nanchuanensis* from seven areas of Chongqing was preliminary analyzed using inter-simple sequence repeat (ISSR) PCR molecular marker technology. The selected 12 pairs of UBC primers were used in this research, and a total of 117 DNA fragments were obtained, of which 113 were polymorphic fragments, and the percentage of polymorphic bands was 96.58%. The analysis by NTSYS pc2.1 software showed that the genetic similarity among *Artocarpus nanchuanensis* from the seven areas was ranged from 0.062~0.989, and the dendrogram was constructed through UPGMA method. The results revealed that these *Artocarpus heterophyllus* Lam. have a similar genetic background with obvious differences. These *Artocarpus heterophyllus* Lam. were obviously divided into four groups, and the cluster is in line with the similar geographical origin of materials, showing a certain regional distribution.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus* Lam.; Inter-simple sequence repeat (ISSR); Genetic diversity; Genetic similarity coefficient; Genetic distance

收稿日期: 2017-03-30

基金项目: 重庆市科委科技研发平台专项(cstc2017yfpt-xyfig0088)

作者简介: 胡连清(1994-), 女, 汉族, 四川宜宾人, 硕士, 研究方向医学遗传与遗传优生优育学. E-mail: 120726584@qq.com

通讯作者: 丁显平. E-mail: branding@scu.edu.cn

1 引言

南川木波罗(*Artocarpus nanchuanensis* S. S. Chang)为桑科(*Moraceae*)木波罗属的常绿乔木,我国特有的由张秀实教授、谭士贤、刘正宇研究员于1989年正式发表的新种.南川木波罗为该属在我国分布最北端的植物^[1],因其种子在野生自然环境下繁殖率极低,2004年被《中国物种红色名录》确定为“极危”物种^[2].目前在南川区发现野生植株32株,綦江发现野生植株10株,其中最大植株高20米,胸径52厘米.该植物虽然为珍稀极危物种,但是其树干直立、粗壮,抗污染、抗病虫害能力强,材质优良,营养价值较高,也常用于医用保健.此外,因其果实成熟时呈橙黄色^[3],色泽、肉质和形状酷似面包,所以人们又称其为“面包树”,具有较高的观赏特性,有望成为庭院绿化、城市行道绿化树种.因此南川木波罗极具科研、保护和经济开发价值^[4].

简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat,简称ISSR)是由Zietkeiwicz等^[5]于1994年发展起来以分子扩增为基础的分子标记技术.ISSR分子标记技术不但利用了RAPD技术的优点和基因组中丰富的SSR序列信息,而且它的重复性比RAPD高,在引物设计上又比SSR简单,且克服了RFLP和RAPD的技术限制,具有无需预知基因组背景信息、DNA模板用量少、信息量大、重复性好、操作简单和多态性高等优点^[6-8].近年来,ISSR分子标记由于优点多应用范围广^[9-10]已被广泛用于很多物种如芒果^[11],木耳^[12],茶树^[13],杜鹃花^[14]等亲缘关系、品种鉴定和遗传多样性等研究^[15-18].目前也有ISSR分子标记技术被用于研究本属菠萝蜜遗传多样性的相关报道^[19],但尚未有专门针对重庆市南川木波罗遗传多样性的研究报道.本研究采用ISSR-PCR技术,在分子水平上对重庆市南川多地及綦江这七个地区野生生长的南川木波罗遗传多样性和遗传结构进行分析和探讨.

2 材料与方法

2.1 材料

本实验南川木波罗样品于2016年11月2日-11日采自重庆市南川的6个地区及綦江上书村,共7个地区,样本46株,其中:綦江东溪镇上书村(SH)11株、南川火葬场(HZC)4株、南川石莲乡松丰村(SF)14株、南川三扒梳(SPS)9株、南川上

岩村(SY)2株、南川千丘村(QQ)4株、南川松林(SL)2株(表1).采集植株上的健康幼嫩叶片,放入装有变色硅胶的自封袋.低温下带回实验室保存在-20℃的冰箱备用.

表1 供试材料

Tab. 1 The tested materials

地区 Locality	海拔/m Altitude(m)	序号 Collection no.
綦江东溪镇上书村	300.1	SH1
綦江东溪镇上书村	309.8	SH2
綦江东溪镇上书村	299.6	SH3
綦江东溪镇上书村(人工培)	295.2	SH4
綦江东溪镇上书村	264.3	SH5
綦江东溪镇上书村	264.3	SH6
綦江东溪镇上书村	280.2	SH7
綦江东溪镇上书村	272.5	SH8
綦江东溪镇上书村	294.3	SH9
綦江东溪镇上书村	290.0	SH10
綦江东溪镇上书村	287.3	SH11
南川火葬场	551.1	ZHC1
南川火葬场	552.3	HZC2
南川火葬场	550.7	HZC3
南川火葬场	554.6	HZC4
南川区石莲乡松丰村	626.8	SF1
南川区石莲乡松丰村	628.2	SF2
南川区石莲乡松丰村	631.8	SF3
南川区石莲乡松丰村	638.2	SF4
南川区石莲乡松丰村	638.1	SF5
南川区石莲乡松丰村	637.8	SF6
南川区石莲乡松丰村	590.2	SF7
南川区石莲乡松丰村	594.5	SF8
南川区石莲乡松丰村	595.3	SF9
南川区石莲乡松丰村	598.8	SF10
南川区石莲乡松丰村	599.0	SF11
南川区石莲乡松丰村	600.1	SF12
南川区石莲乡松丰村	494.1	SF13
南川区石莲乡松丰村	490.3	SF14
南川区三扒梳(人工培)	589.1	SPS1
南川区三扒梳(人工培)	589.3	SPS2
南川区三扒梳(人工培)	589.2	SPS3
南川区三扒梳	582.7	SPS4
南川区三扒梳	635.2	SPS5
南川区三扒梳	642.3	SPS6
南川区三扒梳	640.3	SPS7
南川区三扒梳	642.1	SPS8
南川区三扒梳	642.3	SPS9
南川区上岩村	705.3	SY1
南川区上岩村	708.0	SY2
南川区千丘村	571.9	QQ1
南川区千丘村	571.2	QQ2
南川区千丘村	573.0	QQ3
南川区千丘村	574.0	QQ4
南川松林	638.5	SL1
南川松林	612.5	SL2

LongGene® A200 Gradient Thermal cycle(杭州朗基科学仪器有限公司);核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统(Universal Hood II);JY600C 电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);420-A 电热恒温水箱(江苏新康医疗器械有限公司)。

ISSR 引物(生工生物(上海)生物工程股份有限公司);植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN);2×CTAB 提取缓冲液;DL2000 plus DNA marker(TIANGEN);Taq 酶(Thermo);β-巯基乙醇(Sigma);苯酚(KESHI);氯仿(KESHI);异戊醇(KESHI);异丙醇(KESHI);无水乙醇(KESHI);琼脂糖(SunShineBio);其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

2.2 方法

2.2.1 南川木波罗基因组 DNA 的提取与检测

取南川木波罗健康幼嫩叶片 100mg,置于研钵中加液氮研磨,用 CTAB 方法提取基因组 DNA,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)的说明书纯化 DNA,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,经检测,可见较亮、较清晰的基因组 DNA 条带。可用于随后的 ISSR-PCR 实验,并用紫外分光光度计测定其浓度。将样品稀释为 50ng/μl,置于 -20℃ 冰箱中贮存备用。

2.2.2 ISSR-PCR 扩增与检测 采用生工生物工

程(上海)所合成的 33 对通用引物,从中筛选出可扩增出多条特异性的条带的 ISSR 引物,引物详见表 2。ISSR-PCR 反应体系包括:DNA 模板量为 3 μL(50 ng/μL),2.5 μL dNTPs(0.2 mmol/L),0.3 μL Taq DNA 聚合酶(1.0 U),2.5 μL MgCl₂(2.0 mmol/L),3 μL 引物,加 ddH₂O 至 25 ul。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s,52.2~56.2℃ 退火(退火温度随引物不同变化)50 s,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。

PCR 反应后的扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测:采用 TAE 缓冲液,6×loading buffer:样品为 1:5 混匀后,点样 5μL,引物 PCR 产物电泳:T=1 h,U=100 V,I=120 mA。通过核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统观察结果并记录。

2.2.3 数据处理与分析

ISSR 是显性标记,同一引物不同物种的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,在相同的迁移位置上,有扩增条带的记为 1,无扩增条带的记为 0,用该方法记录电泳图谱上扩增出 DNA 条带,组成“0”和“1”组成的原始矩阵并建立数据库。用 NTSYS-pc2.1 软件计算物种间的 Nei's 遗传距离(GD)和遗传相似系数 GS(1-GD),并根据 GS 值或 GD 值按不加权成对群算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类构建系统树。

表 2 ISSR 多态引物退火温度及其多态率

Tab. 2 The percentage of polymorphic band of 12 ISSR primers and their annealing temperature

引物编号	序列	退火温度(℃)	扩增条带数	多态性条带数	多态百分率(%)
UBC807	(AG) ₈ T	52.2	9	9	100
UBC810	(GA) ₈ T	52.2	13	9	69.23
UBC811	(GA) ₈ C	54.6	10	10	100
UBC815	(CT) ₈ G	54.6	4	4	100
UBC826	(AC) ₈ C	54.6	14	14	100
UBC827	(AC) ₈ G	54.6	6	6	100
UBC841	(GA) ₈ YC	56.2	10	10	100
UBC842	(GA) ₈ YG	56.2	9	9	100
UBC845	(CT) ₈ RG	56.2	6	6	100
UBC855	(AC) ₈ YT	53.9	11	11	100
UBC856	(AC) ₈ YA	53.9	10	10	100
UBC857	(AC) ₈ YG	56.2	15	15	100
合计 Total			117	113	96.58

3 结果与分析

3.1 ISSR 多态性分析

本研究采用 33 条引物进行筛选试验,挑选出

扩增效果最好的引物 12 条,12 个引物全部为多态性引物,多态率达 100%。这 12 条引物在 7 个地区的南川木波罗种质材料上扩增出 117 条条带,多态性条带为 113 条,占 96.58%。平均每个引物产

生 9.42 条条带,每个引物扩增出的 DNA 片段数为 4~15 条,其中 UBC815 扩增出的条带数最少只有 4 条,而 UBC857 扩增出的条带数最多为 15 条(扩增结果见表 2)。证明所用的引物能够对 46 份材料进行较好的区分(图 1),结果显示扩增条带清晰,7 个地区的种质材料具有较明显的遗传多样性,每条引物的扩增片段集中在 250~2000 bp,以 250~2000 bp 居多。每条引物的多态百分率变幅 69.23%~100%。从表 3 可以看出人工培养的 4 株南川木波罗(SH4、QQ1、QQ2、QQ3)基本与各地区野生型南川木波罗的相似性较高,说明人工繁育对南川木波罗遗传多样性的改变较小。

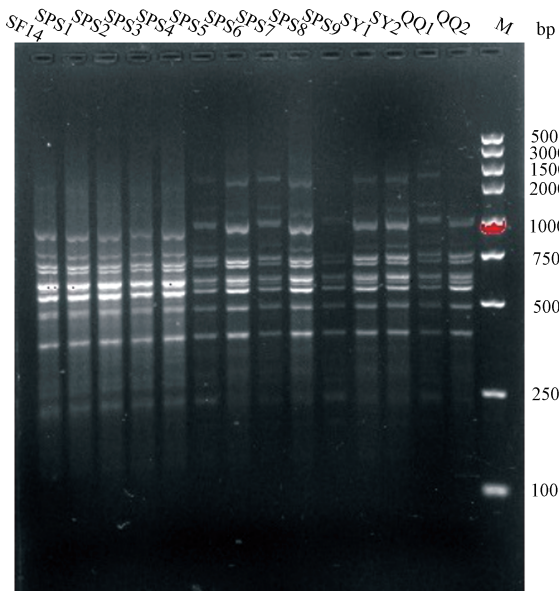


图 1 引物 810 的部分南川木波罗扩增图谱
Fig. 1 Result of PCR amplification using primer 810
of some rtocarpusheterophyllus Lam

3.2 遗传距离与遗传相似性分析

根据 ISSR 扩增出的 113 条 DNA 片段,采用 NTSYS-pc2.1 软件计算出重庆市南川等地区及綦江区南川木波罗样品 Nei's 遗传距离和遗传相似性,获得 Nei's 遗传距离和遗传相似性矩阵(表 3)。从结果可以看出,七个地区的南川木波罗样本的遗传相似性变化范围为 0.062~0.989。其中,SPS2 与 SF4 的遗传距离最近,相似性为 0.989,而亲缘关系最远的是 QQ2(人工培)与 SF3,相似性仅为 0.062,表明七个地区南川木波罗间既有相同的遗传背景又存在明显的差异性。

根据所记录的 0、1 矩阵用 NTSYS-pc2.1 软件进行 UPGMA(类平均)聚类分析,构建聚类图

(图 2)。由图 2 可以看出,7 个地区的南川木波罗明显被分为 4 类,聚类基本符合地理来源相近的材料聚为一类,呈现出一定的地域性分布规律。

4 讨论

4.1 南川木波罗种质的亲缘关系分析

ISSR 是一高度可变的 DNA 区域,有研究表明 ISSR 能比 RAPD 和同功酶产生更高比例的多态性带型^[20~21];相对于 RAPD 而言 ISSR 使用的引物更长,PCR 扩增的退火温度更高,因此,ISSR 分子标记具有更高的可重复性^[22]。本研究利用 12 条 ISSR 引物扩增,得到的南川木波罗 ISSR 带型表现出很高的多态性,多态性带型占 96.58%,46 份材料的相似系数为 0.062~0.989,平均为 0.526,这表明南川木波罗不同材料间相似度高、多态性差,这种多态性对了解南川木波罗的遗传背景、南川木波罗的资源开发利用、新品种的选育及生产提供了理论依据。

本试验研究得出 7 个地区南川木波罗种质之间的亲缘关系远近,从 46 份南川木波罗的聚类图可以看出 46 份材料划分为 4 类,在遗传相似系数约为 0.35 时分为两类,在遗传相似系数约为 0.50 时分为另外两类,值得提出的是,UPGMA 法在阈值为 0.35 时 SPS9 单独聚为一类。7 个地区的南川木波罗基本符合地理来源相近的材料聚为一类,也存在同地区的南川木波罗间有较大的差异,而不同地区的南川木波罗间遗传距离较近,这表明 7 个地区的南川木波罗之间既具有相同的遗传背景又有明显的差异。

4.2 南川木波罗种质遗传多样性的研究意义

南川木波罗独特的基因不仅具有重要的经济观赏价值和药用价值,具有重要的研究价值,但其种群受威胁严重,而对其遗传多样性的研究无疑有助于人们更清楚地认识生物多样性的起源和进化及对微观进化的认识,进而为植物育种和遗传改良奠定基础。植物居群的遗传结构反映了种的长期进化史(分布区转移、生境片段化和居群特化)、突变、遗传漂变、交配系统、基因流和选择等不同过程的相互作用^[23]。南川是木波罗属分布的最北界,7 个地区的地理距离超过 100km,实验结果表明 7 个地区间的南川木波罗产生了明显的遗传分化,这可能是由于突变、遗传漂变及长期自然选择的结果。

表 3 ISSR 标记的 46 份供试材料之间的相似系数
Tab. 3 Genetic similarity of 46 based on ISSR

编号 NO.	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	HZC1	HZC2	HZC3	HZC4	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8		
SH2	0.765																								
SH3	0.758	0.886																							
SH4	0.767	0.894	0.930																						
SH5	0.779	0.915	0.913	0.944																					
SH6	0.701	0.864	0.861	0.855	0.852																				
SH7	0.703	0.833	0.842	0.850	0.884	0.831																			
SH8	0.347	0.310	0.323	0.300	0.330	0.297	0.379																		
SH9	0.734	0.846	0.830	0.849	0.880	0.890	0.862	0.351																	
SH10	0.556	0.576	0.579	0.574	0.576	0.586	0.582	0.526	0.543																
SH11	0.167	0.320	0.313	0.289	0.320	0.306	0.348	0.513	0.288	0.592															
HZC1	0.192	0.297	0.289	0.265	0.297	0.283	0.323	0.650	0.286	0.473	0.811														
HZC2	0.731	0.902	0.864	0.871	0.902	0.865	0.836	0.339	0.891	0.535	0.294	0.291													
HZC3	0.703	0.909	0.872	0.879	0.898	0.885	0.833	0.330	0.898	0.538	0.286	0.283	0.973												
HZC4	0.263	0.327	0.300	0.317	0.346	0.353	0.354	0.465	0.365	0.552	0.700	0.585	0.354	0.345											
SF1	0.321	0.404	0.362	0.396	0.440	0.411	0.475	0.500	0.433	0.571	0.711	0.652	0.424	0.413	0.776										
SF2	0.662	0.868	0.843	0.838	0.857	0.867	0.793	0.264	0.891	0.500	0.288	0.269	0.921	0.928	0.311	0.362									
SF3	0.676	0.841	0.788	0.807	0.841	0.815	0.782	0.349	0.823	0.576	0.340	0.317	0.902	0.886	0.385	0.422	0.879								
SF4	0.639	0.608	0.579	0.607	0.640	0.569	0.615	0.562	0.603	0.684	0.525	0.484	0.582	0.569	0.585	0.269	0.531	0.640							
SF5	0.687	0.805	0.800	0.782	0.792	0.803	0.741	0.347	0.824	0.602	0.337	0.313	0.869	0.865	0.404	0.404	0.874	0.855	0.633						
SF6	0.695	0.876	0.824	0.843	0.864	0.838	0.807	0.333	0.867	0.553	0.324	0.302	0.933	0.917	0.367	0.404	0.909	0.935	0.615	0.927					
SF7	0.622	0.525	0.491	0.522	0.525	0.517	0.418	0.351	0.496	0.472	0.222	0.255	0.551	0.538	0.241	0.317	0.515	0.559	0.557	0.602	0.569				
SF8	0.699	0.874	0.812	0.830	0.862	0.860	0.783	0.336	0.897	0.547	0.309	0.288	0.918	0.925	0.368	0.403	0.917	0.897	0.607	0.888	0.950	0.547			
SF9	0.682	0.821	0.735	0.757	0.795	0.765	0.741	0.378	0.753	0.609	0.414	0.364	0.800	0.785	0.440	0.500	0.781	0.848	0.732	0.808	0.845	0.552	0.832		
SF10	0.690	0.867	0.817	0.835	0.855	0.854	0.812	0.321	0.880	0.535	0.275	0.255	0.923	0.941	0.372	0.390	0.901	0.890	0.582	0.881	0.944	0.520	0.940		
SF11	0.690	0.855	0.817	0.835	0.867	0.842	0.800	0.339	0.870	0.551	0.294	0.273	0.945	0.941	0.372	0.406	0.901	0.913	0.582	0.869	0.944	0.551	0.940		
SF12	0.682	0.838	0.756	0.777	0.825	0.785	0.750	0.343	0.795	0.544	0.354	0.309	0.852	0.849	0.400	0.457	0.809	0.863	0.661	0.826	0.885	0.632	0.817		
SF13	0.152	0.213	0.200	0.198	0.213	0.239	0.256	0.303	0.210	0.417	0.600	0.581	0.213	0.208	0.706	0.615	0.196	0.234	0.400	0.247	0.222	0.125	0.212		
SF14	0.699	0.865	0.838	0.857	0.877	0.840	0.797	0.345	0.857	0.560	0.318	0.296	0.933	0.929	0.378	0.414	0.899	0.912	0.606	0.867	0.943	0.544	0.939		
SFS1	0.695	0.840	0.848	0.819	0.840	0.826	0.783	0.352	0.844	0.570	0.324	0.302	0.910	0.917	0.385	0.386	0.866	0.876	0.600	0.902	0.908	0.553	0.905		
SFS2	0.690	0.879	0.840	0.859	0.879	0.854	0.812	0.339	0.870	0.551	0.312	0.291	0.934	0.941	0.372	0.407	0.901	0.913	0.597	0.869	0.944	0.535	0.940		
SFS3	0.685	0.865	0.814	0.833	0.877	0.828	0.810	0.345	0.857	0.560	0.318	0.296	0.933	0.929	0.378	0.413	0.889	0.912	0.606	0.880	0.932	0.560	0.928		
SFS4	0.676	0.871	0.843	0.850	0.870	0.845	0.802	0.330	0.851	0.565	0.321	0.299	0.939	0.934	0.364	0.400	0.904	0.906	0.595	0.885	0.937	0.565	0.922		

(续表 3)

编号 NO.	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6	SH7	SH8	SH9	SH10	SH11	HZC1	HZC2	HZC3	HZC4	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8
SPS5	0.495	0.620	0.560	0.603	0.620	0.583	0.628	0.471	0.571	0.620	0.462	0.455	0.609	0.596	0.406	0.541	0.571	0.667	0.733	0.581	0.627	0.506	0.604
SPS6	0.672	0.837	0.738	0.760	0.810	0.795	0.731	0.370	0.756	0.598	0.337	0.311	0.827	0.824	0.344	0.408	0.795	0.837	0.614	0.784	0.861	0.636	0.859
SPS7	0.458	0.468	0.449	0.426	0.486	0.422	0.524	0.640	0.426	0.523	0.468	0.583	0.450	0.439	0.392	0.535	0.388	0.469	0.667	0.415	0.445	0.400	0.446
SPS8	0.652	0.837	0.798	0.805	0.849	0.812	0.793	0.342	0.842	0.524	0.278	0.294	0.906	0.902	0.304	0.539	0.874	0.884	0.541	0.826	0.904	0.556	0.901
SPS9	0.159	0.176	0.184	0.182	0.176	0.202	0.217	0.333	0.176	0.311	0.444	0.286	0.180	0.175	0.387	0.444	0.165	0.198	0.308	0.209	0.188	0.222	0.178
SY1	0.671	0.845	0.793	0.788	0.833	0.807	0.775	0.355	0.816	0.541	0.269	0.286	0.903	0.900	0.315	0.370	0.849	0.869	0.543	0.810	0.879	0.557	0.876
SY2	0.656	0.747	0.712	0.748	0.773	0.716	0.732	0.427	0.733	0.596	0.372	0.391	0.792	0.778	0.400	0.463	0.738	0.827	0.649	0.745	0.787	0.558	0.763
QQ1	0.385	0.396	0.373	0.408	0.396	0.385	0.429	0.533	0.376	0.533	0.476	0.465	0.383	0.373	0.478	0.627	0.339	0.377	0.537	0.376	0.378	0.433	0.362
QQ2	0.654	0.741	0.641	0.697	0.681	0.692	0.614	0.351	0.630	0.494	0.253	0.222	0.708	0.694	0.213	0.275	0.680	0.696	0.542	0.631	0.729	0.607	0.717
QQ3	0.662	0.807	0.752	0.772	0.783	0.767	0.719	0.320	0.791	0.522	0.247	0.245	0.823	0.832	0.238	0.321	0.804	0.770	0.541	0.756	0.831	0.539	0.842
QQ4	0.681	0.867	0.790	0.810	0.843	0.805	0.784	0.323	0.814	0.550	0.294	0.272	0.869	0.876	0.283	0.360	0.826	0.843	0.551	0.795	0.865	0.550	0.864
SL1	0.678	0.795	0.690	0.755	0.753	0.784	0.681	0.353	0.726	0.640	0.317	0.265	0.787	0.785	0.326	0.396	0.744	0.795	0.598	0.752	0.795	0.660	0.782
SL2	0.729	0.853	0.798	0.831	0.854	0.800	0.778	0.333	0.798	0.540	0.258	0.255	0.855	0.864	0.247	0.333	0.811	0.815	0.559	0.763	0.852	0.595	0.850
SF9	SF10	SF11	SF12	SF13	SF14	SF15	SPS1	SPS2	SPS3	SPS4	SPS5	SPS6	SPS7	SPS8	SPS9	SY1	SY2	QQ1	QQ2	QQ3	QQ4	SL1	
SF10	0.800																						
SF11	0.800	0.956																					
SF12	0.857	0.864	0.888																				
SF13	0.296	0.214	0.213	0.244																			
SF14	0.810	0.956	0.978	0.874	0.217																		
SPS1	0.782	0.921	0.955	0.873	0.222	0.943																	
SPS2	0.813	0.967	0.978	0.888	0.214	0.989	0.955																
SPS3	0.810	0.933	0.978	0.898	0.218	0.966	0.966	0.967															
SPS4	0.802	0.927	0.961	0.880	0.220	0.960	0.949	0.961	0.972														
SPS5	0.690	0.594	0.609	0.672	0.271	0.618	0.597	0.623	0.632	0.637													
SPS6	0.829	0.840	0.852	0.872	0.169	0.863	0.810	0.864	0.850	0.830	0.678												
SPS7	0.510	0.417	0.433	0.468	0.341	0.458	0.448	0.450	0.458	0.444	0.711	0.520											
SPS8	0.767	0.906	0.939	0.845	0.137	0.939	0.904	0.939	0.949	0.921	0.628	0.870	0.471										
SPS9	0.231	0.160	0.180	0.206	0.286	0.184	0.187	0.180	0.184	0.185	0.321	0.200	0.368	0.162									
SY1	0.774	0.904	0.927	0.817	0.143	0.926	0.890	0.926	0.914	0.908	0.632	0.854	0.470	0.966	0.168								
SY2	0.818	0.780	0.805	0.795	0.200	0.828	0.800	0.817	0.828	0.821	0.696	0.806	0.557	0.848	0.208	0.857							
QQ1	0.473	0.348	0.365	0.412	0.333	0.372	0.342	0.365	0.372	0.375	0.592	0.421	0.642	0.368	0.424	0.400	0.500						
QQ2	0.737	0.708	0.722	0.733	0.062	0.732	0.657	0.722	0.704	0.695	0.560	0.790	0.539	0.727	0.194	0.734	0.678	0.442					
QQ3	0.716	0.859	0.859	0.790	0.110	0.869	0.831	0.871	0.845	0.826	0.571	0.813	0.463	0.864	0.136	0.848	0.748	0.408	0.728				
QQ4	0.771	0.891	0.903	0.840	0.145	0.902	0.877	0.914	0.902	0.872	0.611	0.852	0.460	0.931	0.172	0.929	0.816	0.389	0.745	0.920			
SL1	0.752	0.800	0.800	0.761	0.184	0.797	0.755	0.813	0.784	0.776	0.612	0.844	0.452	0.805	0.219	0.813	0.742	0.432	0.786	0.811	0.851		
SL2	0.736	0.867	0.867	0.797	0.115	0.890	0.840	0.892	0.866	0.847	0.590	0.877	0.500	0.897	0.143	0.882	0.811	0.424	0.781	0.909	0.918	0.863	

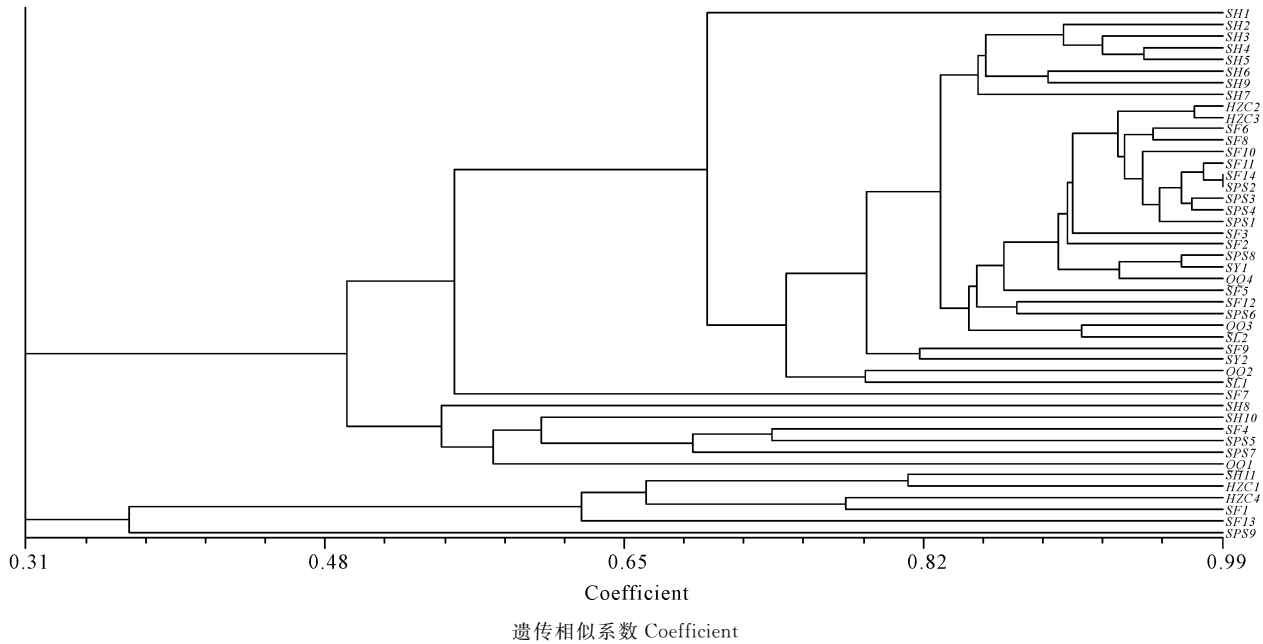


图 2 基于 ISSR 标记的 46 份南川木波罗资源聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis based on ISSR of 46 *reticarpusheterophyllus* Lam material number was showed in table 1.

综上所述,本实验对重庆市南川及綦江的南川木波罗遗传多样性从 DNA 分子水平上研究了七个地区南川木波罗的遗传关系,为进一步研究南川木波罗的遗传关系奠定了基础.由于野生南川木波罗的稀少且其利用价值极高,人们开始大规模的人工培育,本研究可以为南川木波罗大量人工繁殖并保持物种多样性提供重要的参考,在维持其多样性的前提下条件下扩增其种群数量.

参考文献:

- [1] 吴征镒,张秀实. 中国桑科的一些新分类单位[J]. 云南植物研究, 1989, 11: 24.
- [2] 汪松. 中国物种红色名录[M]. 北京:高等教育出版社, 2004.
- [3] 李瑞梅,胡新文,郭建春,等. 菠萝蜜研究概述[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36: 77.
- [4] 孙容. 南川木菠萝种质资源保护和开发利用对策[J]. 绿色科技, 2011, 09: 20.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 178.
- [6] Blair MW, Panaud O, McCoush S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 780.
- [7] Buczkowska K, Rabska M, Gonera P, et al. Effectiveness of ISSR markers for determination of the *Aneura pinguis* cryptic species and *Aneura maxima* [J]. Biochem Syst Ecol, 2016, 68: 27.
- [8] Tiwari G, Singh R, Singh N, et al. Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in *Kalmegh* [J]. Ind Crop Prod, 2016, 86: 1.
- [9] Gupta M, Chyi Y S, Romere-severaon J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. Appl Genet, 1994, 89: 998.
- [10] Li J M, Jin Z X. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv based on ISSR polymorphism and implications for its conservation [J]. Genetics, 2008, 133: 227.
- [11] Zhang Q X, Shen Y K, Shao R X, et al. Genetic diversity of natural *Miscanthus sinensis* populations in China revealed by ISSR markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2013, 48: 248.
- [12] Du P, Cui B K, Zhang C F, et al. Genetic diversity of wild *Auricularia auricula-judae* revealed by ISSR analysis [J]. Biochem Syst Ecol, 2013, 48: 199.
- [13] 沈程文,黄建安,赵世浩. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析广东茶树种质资源的遗传多样性[J]. 核农学报, 2010, 24: 948.

- [14] 钟容,丁显平,李创,等.金佛山特有杜鹃花遗传多样性分析[J].四川大学学报:自然科学版,2015,52:389.
- [15] 刘小莉,刘飞虎,李宗菊,等.10种报春花亲缘关系的ISSR分析[J].云南大学学报:自然科学版,2004,26:454.
- [16] Yamgishi M, Abe H, Nakano M *et al.* PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily [J]. *Sci Hortic-amsterdam*, 2002, 96: 225.
- [17] Zhu L J, Qiao C, Shen X Y, *et al.* Iridoid glycosides from the roots of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl [J]. *Chinese Chem Lett*, 2014, 25: 1354.
- [18] Chen D X, Li L Y, Song C Q, *et al.* Study on Control Efficiency of Several Fungicides on Spot Blight in *Scrophularia ningpoensis* Hemsl [J]. *Med Plant*, 2011, 2: 27.
- [19] 叶春海,王耀辉,李映志,等.菠萝蜜遗传多样性的ISSR分析[J].果树学报,2009,26:659.
- [20] 钱韦,葛颂,洪德元.采用RAPD和ISSR标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J].植物学报,2000,42:741.
- [21] Ge X J, Sun M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrtinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8: 2061.
- [22] Camacho F J, Liston A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Am J Bot*, 2001, 88: 1065.
- [23] Schaal B A, Hayworth D A, Olsen K M, *et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 465.

引用本文格式:

中文:胡连清,王清明,丁显平,等.极危物种——南川木波罗遗传多样性ISSR分析[J].四川大学学报:自然科学版,2018,55:865

英文:Hu L Q, Wang Q M, Ding X P, *et al.* ISSR analysis of the genetic diversity of *Artocarpus nanchuanensis*, a critically endangered species, in Nanchuan District, Chongqing [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 865.