

王贵,李蕊蕊,吴茂宏,等.基于IRAP标记的沙子空心李遗传多样性评价及指纹图谱构建[J].华中农业大学学报,2023,42(1):1-11.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.01.001

**主持人语:**植物种质资源是国家战略性资源,也是新品种选育的基础,对农业和生态安全具有不可替代的作用,世界各国对植物种质资源研究极为重视。近年来,我国山地植物资源领域的广大科学工作者根据植物生物科学的现状和发展趋势,围绕国家种质资源的保护利用、生态环境建设、精准扶贫和乡村振兴的发展战略,针对喀斯特山地特色植物优新种质鉴定、多样性保护、优异基因发掘、种质创新、生产服务一体化领域存在的重大科学问题开展了卓有成效的研究工作,为地方经济及产业发展、脱贫攻坚和乡村振兴提供了理论和技术支持。为了科学展示山地特色植物种质评价与保存、优异基因资源发掘与新种质创制、资源产业化利用等领域取得的重要成果,本期专栏以“山地植物资源保护与种质创新”为主题,聚焦喀斯特山地特色植物种质资源评价与保存、优异基因资源发掘与利用、植物抗逆生物学等领域存在的科学问题组织稿件,共录用文章9篇,涉及园艺、药用及牧草等植物种质评价、优异基因挖掘、抗逆生理特性等方面,希望能引起同行的关注。

## 基于IRAP标记的沙子空心李遗传多样性评价 及指纹图谱构建

王贵<sup>1</sup>,李蕊蕊<sup>1</sup>,吴茂宏<sup>2</sup>,任菲宏<sup>3</sup>,王丽丽<sup>4</sup>,乔光<sup>1</sup>

1. 贵州大学生命科学学院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室,贵阳 550025;
2. 贵州省铜仁市林业科学院,铜仁 554300;
3. 贵州省铜仁市农业科学院,铜仁 554300; 4. 贵州省农业科学院,贵阳 550006

**摘要** 通过走访调查,选取92株具有优良性状的沙子空心李种质,根据李反转录转座子的RT序列开发IRAP标记引物,设计 $L_{16}(4^3)$ 的正交试验优化10  $\mu$ L IRAP-PCR主要影响因素的含量;利用18条IRAP引物对92份沙子空心李进行遗传多样性分析,构建供试种质的指纹图谱。结果显示:最优的10  $\mu$ L IRAP-PCR反应体系为 $10^{-5}$  mol/L IRAP引物1.3  $\mu$ L,PCR Mix 5.0  $\mu$ L、模板DNA(30 ng/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L,PCR循环40次。18条IRAP引物共扩增出189个位点,多态性位点180个,等位基因数、有效等位基因数、Nei's基因多样性指数和Shannon指数均值分别为1.930、1.426、0.261及0.405。采用邻接法将92份沙子空心李聚类为4个类群。确定IRAP引物Ty3-2及Ty3-6为核心引物,可高效构建92份供试种质的指纹图谱。

**关键词** 沙子空心李;种质资源;分子标记;IRAP;指纹图谱;遗传多样性;种质创新

**中图分类号** S662.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)01-0001-11

沙子空心李(*Prunus salicina* Lindl. 'Shazikongxinli'),为蔷薇科李属植物、青皮黄肉李品种,是贵州省沿河土家族自治县栽培的地方特色水果,于2006年被批准为国家地理标志保护产品<sup>[1]</sup>。据沿河县县志记载,沙子空心李系1858年由外地引进栽培,属中国李的一类地方品种,由于沿河县独特的地理、气候和富含硒等多种微量元素的土壤条件适宜其生长,

逐渐育成了这一优异地方李品种。目前沙子空心李主栽于沿河县南庄村沙子、中界等乡镇,投产种植面积已达30 km<sup>2</sup>,还未发现过野生资源。经过160多年的自然演变及人为选育栽培,沙子空心李逐渐形成品种群。近年来沿河县大面积发展沙子空心李,种苗生产混乱、接穗来源异质化,进一步促成沙子空心李品种的多样化<sup>[2]</sup>。通过笔者所在课题组走访调查

收稿日期:2022-08-30

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]1Y023);贵州省科技计划项目(黔科合服企[2019]4013);中央引导地方科技发展基金项目(黔科中引地[2021]4010)

王贵,E-mail:2051647320@qq.com

通信作者:乔光,E-mail:13518504594@163.com

发现,目前生产的沙子空心李在成熟时间及果实品质上存在差异。差异株系的存在为优异种质的挖掘提供了种质资源基础,但这些差异是仅由环境因素或栽培技术不同引起的,还是遗传信息发生不同程度的变异尚未明确。只有了解种质资源的遗传变异水平及亲缘关系,才能高效地选配亲本,培育出优异品系<sup>[3]</sup>。因此,有必要通过DNA分子标记技术从基因水平上对沿河县沙子空心李种质资源进行遗传多样性评价。

DNA分子标记技术,如RAPD、SSR及ISSR,已经广泛用于李研究的不同领域<sup>[4]</sup>,但IRAP(inter-retrotransposon amplified polymorphism, 逆转座子位点扩增多态性)标记的应用研究还鲜有报道。IRAP是Kalendar等<sup>[5]</sup>于1999年基于植物反转录转座子转座特性而建立的一种分子标记技术,具有高通量、基因组覆盖范围广、多态性丰富及异质性等优点<sup>[6-7]</sup>。

现已应用于樱桃<sup>[8]</sup>、梨<sup>[9]</sup>、葡萄<sup>[10]</sup>、火龙果<sup>[11-12]</sup>、梅<sup>[13]</sup>等亲缘关系鉴定及遗传多样性分析等研究。

本研究依据品种成熟期、果实品质、高产稳产这几个育种目标选择了92株具有优良性状的沙子空心李作为试验材料,采用IRAP标记技术,系统评价供试材料遗传多样性水平及亲缘关系,同时构建沙子空心李指纹图谱,旨在为沙子空心李优异种质的辅助育种、科学利用及保护等提供理论依据与应用参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

于2020年7月对贵州省沿河县南庄村等地进行实地走访调查,选取92株具有优良性状(高品质、高产稳产等)、健康的沙子空心李作为试验材料(表1)。于2022年4月取92份供试种质的幼嫩叶片,用于后续基因组DNA提取。

表1 92份沙子空心李种质材料

Table 1 Ninety-two germplasm resources of Shazikongxinli for IRAP analysis

采样地点 Locality	编号 Code	种质 Germplasms	突出性状 Highlighting botanical traits
	1	N1	产量高 High yield
	2	N2	产量高,口感好 High yield and good taste of fruit
	3	N3	产量高,口感好 High yield and good taste of fruit
	4	N4	花期迟 Late flowering
	5	N5	花期迟 Late flowering
	6	N6	花轮簇生,树皮较黑 Flowers in clusters, bark darker
	7	N7	实生苗,产量高、稳 Seedling, high and stable yield
	8	N8	实生苗,产量稳,果实大 Seedling, stable yield and large fruit
	9	N9	实生苗,产量稳,果实大 Seedling, stable yield and large fruit
	10	N10	花轮簇生,成团状 Flowers in clusters
贵州省沿河县 南庄村 Nanzhuang Village, Yanhe County, Gui- zhou Province	11	N11	早熟 Early ripening fruit
	12	N12	早熟,果实口感好 Early ripening fruit and good taste
	13	N13	晚熟 Late ripening fruit
	14	N14	树龄>80 a,果实口感好 Tree age >80 years, good taste of fruit
	15	N15	果实中等大小,口感好 Medium sized fruits and good taste
	16	N16	果实多,果小 Many but small fruit
	17	N17	果较大,品质好 Large fruit and good taste
	18	N18	果实口感好 Good taste of fruit
	19	N19	树龄>100 a,产量高,果实大 Trees age>100 years, high yield
	20	N20	产量稳,果圆 Steady yield, round fruit
	21	N21	果大果圆 Large and round fruit
	22	N22	果实最大,约100 g The largest fruit, about 100 g
	23	N23	树龄>80 a,果大皮薄 Tree age >80 years, large fruit and thin skin
	24	N24	果实大,口感好 Large fruit and good taste
	25	N25	早熟,树干有刺 Early ripening fruit, thorny trunk

续表 1 Continued Table 1

采样地点 Locality	编号 Code	种质 Germplasms	突出性状 Highlighting botanical traits
	26	N26	树龄>40 a Tree age >40 years
	27	N27	果实口感最好 Best fruit taste
	28	N28	产量高,果实大 High yield, large fruit
	29	N29	早熟,果实中等大小 Early ripening fruit, medium sized fruit
	30	N30	结果少,果实大,口感好 Few fruits, large fruits, good taste
	31	N31	果大,叶片较大 Large fruit, large leaves
	32	N32	早熟,果皮厚 Early ripening fruit, thick skin
	33	N33	树龄>70 a Tree age >70 years
	34	N34	树龄>70 a Tree age >70 years
	35	N35	早熟 Early ripening fruit
	36	N36	树龄>80 a,果大、甜 Tree age >80 years, large and sweet fruit
	37	N37	口感好 Good taste of fruit
	38	N38	果实大 Large fruit
	39	N39	高品质 Good quality
	40	N40	早熟 Early ripening fruit
	41	L1	实生苗,树龄>80 a,果大,品质好 Seedling, tree age >80 years, large fruit, good quality
	42	L2	实生苗,树龄>80 a,果大,品质好 Seedling, tree age >80 years, large fruit, good quality
	43	L3	实生苗,树龄>50 a,果大,品质好 Seedling, tree age >50 years, large fruit, good quality
	44	L4	实生苗,树龄>50 a,果大,品质好 Seedling, tree age >50 years, large fruit, good quality
	45	L5	实生苗,树龄>50 a,产量高,早熟 Seedling, tree age >50 years, high yield, early ripening fruit
	46	L6	树龄>50 a Tree age >50 years
	47	L7	果大,品质好 Large fruit and good quality
	48	L8	花簇生,果实品质好 Flowers in clusters, good fruit quality
	49	L9	树龄>80 a,果大品质好 Tree age >80 years, large fruit and good quality
	50	L10	果大,品质好 Large fruit and good quality
	51	L11	树龄>60 a,果大皮薄 Tree age >60 years, large fruit and thin skin
	52	L12	果大皮薄,口感好 Large fruit and thin skin, good taste
贵州省沿河县 黎家寨	53	L13	果大皮薄,口感好 Large fruit and thin skin, good taste
Lijia Village,	54	L14	树龄>60 a,果大皮薄 Tree age >60 years, large fruit and thin skin
Yanhe County,	55	L15	树龄>60 a,果实品质好 Tree age >60 years, good quality
Guizhou Prov-	56	L16	树龄>60 a,果大皮薄 Tree age >60 years, large fruit and thin skin
ince	57	L17	树龄>70 a,果大皮薄 Tree age >70 years, large fruit and thin skin
	58	L18	树龄>20 a,产量高 Trees age >20 years, high yield
	59	L19	树皮紫红色,果大皮薄 Purple-red bark, large fruit and thin skin
	60	L20	树龄>60 a,树皮黄红色 Trees age >60 years, bark iron red
	61	L21	果大,品质好 Large fruit and good quality
	62	L22	果大,品质好 Large fruit and good quality
	63	L23	树龄>30 a,果大皮薄 Tree age >30 years, large fruit and thin skin
	64	L24	树龄>60 a,果大果圆 Tree age >60 years, large and round fruit
	65	L25	树龄>70 a,果大果圆 Tree age >70 years, large and round fruit
	66	L26	花轮簇生 Flowers in clusters
	67	L27	果大 Large fruit
	68	L28	花轮簇生,果大 Flowers in clusters, large fruit
	69	L29	果大皮薄 Large fruit and thin skin

续表 1 Continued Table 1

采样地点 Locality	编号 Code	种质 Germplasms	突出性状 Highlighting botanical traits
	70	L30	果大皮薄 Large fruit and thin skin
	71	L31	晚熟 Late ripening fruit
	72	L32	早熟,果实不离核 Early ripening, flesh does not separate from the core
	73	P1	早熟,果实心形,果抗性差,易裂果 Early maturity, heart-shaped fruit, poor fruit resistance, easy to split fruit
贵州省沿河县	74	P2	早熟,果实心形,果抗性差,易裂果 Early maturity, heart-shaped fruit, poor fruit resistance, easy to split fruit
十二盘村 Shierpan Village, Yanhe	75	P3	早熟,果实心形,果抗性差,易裂果 Early maturity, heart-shaped fruit, poor fruit resistance, easy to split fruit
County, Gui- zhou Province	76	P4	早熟,果实心形,果抗性差,易裂果 Early maturity, heart-shaped fruit, poor fruit resistance, easy to split fruit
	77	P6	早熟,果实心形,果抗性差,易裂果 Early maturity, heart-shaped fruit, poor fruit resistance, easy to split fruit
	78	P7	无 None
	79	P8	花期晚,产量高 Late flowering and high yield
	80	P9	果实品质好 Good quality of fruit
	81	S1	树龄>50 a Tree age >50 years
	82	S2	树龄>100 a Tree age >100 years
	83	S3	树龄>100 a Tree age >100 years
贵州省沿河县	84	S4	果实品质好 Good quality of fruit
孙家寨	85	S5	果大,品质好 Large fruit and good quality
Sunjiazhai Vil- lage, Yanhe	86	S6	果大,果皮光滑 Large fruit with smooth skin
County, Gui- zhou Province	87	S7	早熟 Early ripening fruit
	88	S8	果实品质好 Good quality of fruit
	89	S9	果实品质好 Good quality of fruit
	90	S10	树龄>50 a Tree age >50 years
	91	S11	果大,品质好 Large fruit and good quality
	92	S12	产量高,稳定 High and stable yield

## 1.2 基因组 DNA 提取

通过植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP320(北京,天根)提取 92 份供试材料幼嫩叶片 DNA 后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量及浓度后,将 DNA 稀释至约 30 ng/ $\mu$ L,置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.3 IRAP 引物开发

通过 Clustal W 对李反转录转座子 *Ty1-copia* 和 *Ty3-gypsy* 的 RT 序列 (NCBI: K78998~K79023; K79024~K79041) 进行多序列比对,获得保守区域,采用 Primer 5.0 程序以保守区域上游序列设计单向引物<sup>[14]</sup>,共获得 65 条 IRAP 引物,由上海生工合成。

## 1.4 IRAP-PCR 体系优化

设计  $L_{16}(4^3)$  正交试验(表 2)优化 10  $\mu$ L 沙子空心李 IRAP-PCR 反应体系的主要影响因素 Mix(赛默飞; 0.4 mmol/L *Taq* DNA 聚合酶、0.4 mmol/L

dNTP、4 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ )、IRAP 引物和模板 DNA 的用量;PCR 扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,51~58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min;72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存;在此基础上对 PCR 循环次数设置 3 个梯度:30、35 及 40 次。

## 1.5 IRAP 引物筛选与 PCR 扩增

根据已优化的 10  $\mu$ L IRAP-PCR 体系,随机选取 8 个供试种质 DNA 作为模板,利用筛选出来的 IRAP 引物对 92 份沙子空心李种质进行 PCR 扩增,每个引物重复 2~3 次,PCR 产物在 1 $\times$ TAE 缓冲液中用 1.5% 琼脂糖凝胶以 6 V/cm 电泳 40 min 后,于凝胶成像系统中观察并保存图像。

## 1.6 数据处理与分析

仅统计每个引物清晰明亮且可重复的条带,有和无条带分别以“1”和“0”记录,获得每个引物的数据矩阵,通过 POPGEN 1.32<sup>[15]</sup> 分析每个 IRAP 引物

表2  $L_{16}(4^3)$  正交试验表  
Table 2 Table of  $L_{16}(4^3)$  orthogonal experiments

编号 No.	模板DNA Template DNA (30 ng/ $\mu$ L)	PCR Mix	IRAP引物 IRAP primer ( $10^{-5}$ mol/L)
1	0.6	3.0	0.7
2	0.6	4.0	1.3
3	0.6	5.0	1.6
4	0.6	6.0	1.0
5	1.0	3.0	1.0
6	1.0	4.0	1.6
7	1.0	5.0	1.3
8	1.0	6.0	0.7
9	1.4	3.0	1.3
10	1.4	4.0	0.7
11	1.4	5.0	1.0
12	1.4	6.0	1.6
13	1.8	3.0	1.6
14	1.8	4.0	1.0
15	1.8	5.0	0.7
16	1.8	6.0	1.3

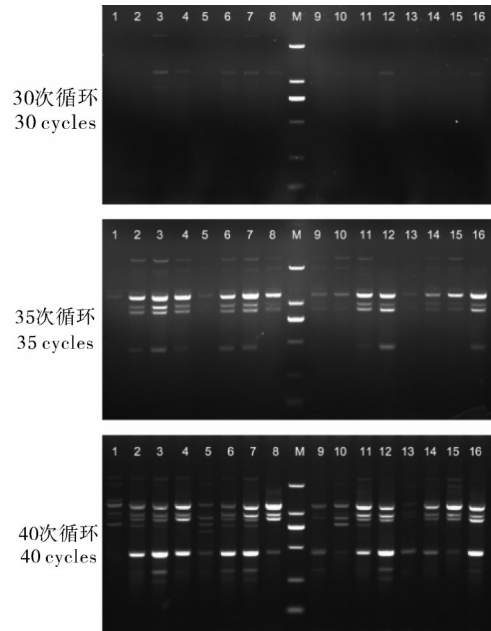
的等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数及 Shannon 指数; 利用 NTSYS 2.10e 软件<sup>[16]</sup> 计算遗传相似性系数后, 通过 MEGA11 采用邻接法 (neighbor-joining) 进行聚类, 利用 Evolview (<http://evolgenius.info>) 美化聚类图。根据使用最少引物鉴定尽量多供试种质的原则, 确定核心引物, 直接以统计获得的 0/1 数据作为指纹代码, 通过条形码和二维码生成器 (<http://qr-batch.com/>) 构建供试种质分子身份证。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 反应体系优化

PCR 体系优化试验见图 1, 泳道 1~16 分别对应正交试验表 (表 2) 中体系 1~16, PCR 循环次数依次为 30、35、40。PCR 结果显示, 循环 40 次为最优。根据 40 次循环中电泳条带的数量、明暗及清晰度, 16 个 PCR 体系从优到差的排序为: 7-12-11-16-3-4-8-2-6-14-15-10-5-9-1-13。通过对上述处理的各个因子比较可知, IRAP 引物和 Mix 含量是影响条带多少及明暗程度的主要因素。体系 1、5、9、13 中 Mix 含量 (3.0  $\mu$ L) 最少, 条带均较少且不明亮; 而体系 2、6、10、14 中 Mix 含量 (4.0  $\mu$ L) 相同, 体系 10 及 14 引物含量 (0.7  $\mu$ L 及 1.0  $\mu$ L) 相对较少, 导致 PCR 结果相对较差; 同理, 体系 8 及 15 也是如此。综上, 考虑经

济成本等因素, 确定 PCR 体系 (10  $\mu$ L) 最优为体系 7:  $10^{-5}$  mol/L IRAP 引物 1.3  $\mu$ L, PCR Mix 5.0  $\mu$ L、模板 DNA (30 ng/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51~58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 次循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。



M: DL2000 DNA marker; 数字 1~16 代表 1~16 个 PCR 体系 (表 2) 1-16 represent 1-16 PCR systems (see Table 2).

图 1 10  $\mu$ L IRAP-PCR 体系优化结果

Fig.1 Optimization results of 10  $\mu$ L IRAP-PCR system

### 2.2 IRAP 引物筛选

对设计的 65 条 IRAP 引物进行筛选, 最终筛选出 18 条多态性良好、条带清晰且可重复性强的 IRAP 引物, 且确定最佳退火温度为 51~58  $^{\circ}$ C (表 3), 部分引物筛选结果见图 2。

### 2.3 IRAP 引物多态性分析

通过筛选出的 18 条 IRAP 引物对 92 份沙子空心李进行 PCR 分析, 结果 (表 4) 显示, 18 条 IRAP 引物共扩增出 189 个位点, 其中多态性位点 180 个, 平均多态性位点比率为 95.24%。18 条引物的有效扩增位点数 4~17, 平均每个引物扩增 10.5 个位点, 其中引物 Ty3-2 扩增出的位点数目最多, 共 17 个, 而 Ty3-14 扩增位点数则最少, 仅 4 个; 另外, 种质 N39 扩增出的位点数最多, 为 118 个, 种质 N10 扩增出的位点数则最少, 共 47 个。18 条 IRAP 引物中多态性位点比例达到 100% 的共有 12 条, 表明这些引物具有较高的多态性, 能够鉴别沙子空心李。引物 Ty3-2 及 Ty3-6 对 92 份沙子空心李种质 PCR 扩增结果见图 3。



表3 18条IRAP引物信息

Table 3 Information of 18 IRAP primers

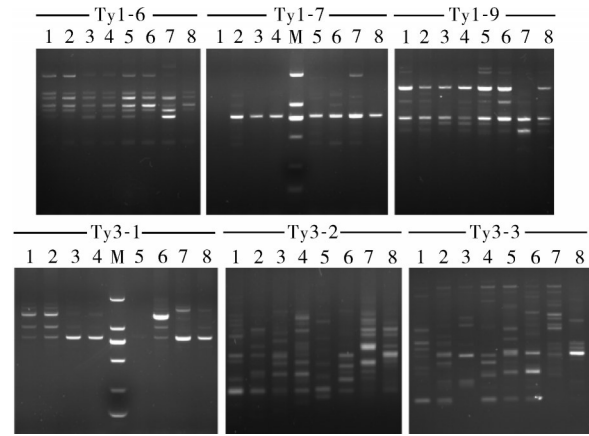
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature
Ty1-2	TGGCCTGAAACAGTCTC	52.0
Ty1-3	CGGAGACTTAGAAGAG- GAG	52.4
Ty1-6	CAACCACAAGGGTAT- GAAG	52.7
Ty1-7	AAGGAAGTCCCTGTAT- GGC	54.3
Ty1-9	GGTTTGCTGGTT- GAAGAAGT	54.0
Ty1-15	AGAAGGCACTTTACG- GATTG	52.3
Ty1-17	ATATGGAACAGC- CAGAAGG	52.1
Ty1-18	AAGGCAGTGGAA- CAAGAAG	53.0
Ty1-20	TCAGACAATTCGCAG- GAGG	55.0
Ty1-25	ACCAGAAGGGTTTGTT- GAA	51.0
Ty3-1	TCTGGCTATCAC- CAAGTCC	54.1
Ty3-2	GAATCGGTATCCATT- GTCG	52.2
Ty3-3	TGGCTATCAC- CAAGTCTGC	55.1
Ty3-5	CAACGCTC- CAACTTCTTTC	52.3
Ty3-6	CCGCCCTTTCATTGAC- GACT	58.0
Ty3-9	ACCAGCACATCCCTA- ACCT	55.9
Ty3-14	CGAGGATTGATGACTT- GCT	51.9
Ty3-16	CCCATACATCCTTCAT- CACAG	54.0

## 2.4 IRAP遗传多样性指数

通过Popgene 1.32对统计的0、1数据进行统计分析,结果(表4)显示,单个引物的等位基因数为1.667(Ty1-17)~2.000,平均等位基因数1.930;有效等位基因数为1.046(Ty1-2)~1.647(Ty1-18),均值1.426;Nei's基因多样性指数变幅为0.041(Ty1-2)~0.379(Ty3-3),平均值0.261;Shannon信息指数变幅为0.089(Ty1-2)~0.563(Ty3-3),平均值0.405;4个遗传参数中,引物Ty1-7、Ty1-18及Ty3-3等各项值均相对较高,而引物Ty1-2及Ty1-3则相对偏低。

## 2.5 沙子空心李种质聚类分析

利用NTSYS 2.10e软件计算供试种质的遗传相



M:DL2000 DNA Marker;数字1~8代表8个不同种质 1-8 represent 8 different germplasm.

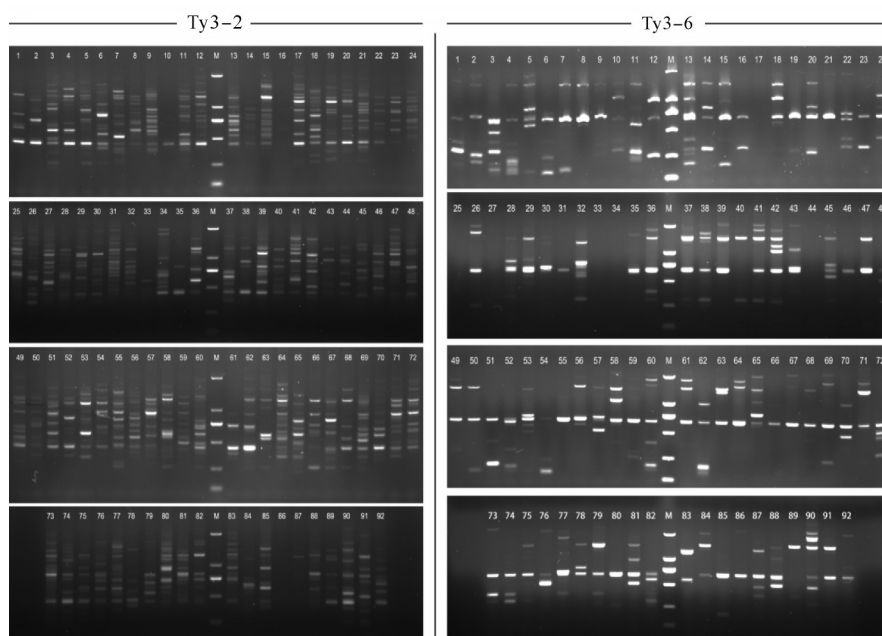
图2 6条IRAP引物筛选结果

Fig.2 Screening results of 6 IRAP primers

似性系数(DICE系数)。92份沙子空心李种质两两之间的DICE系数变幅为0.417~0.830,平均0.681。在遗传相似系数为0.645时,92份沙子空心李被聚类为4组(图4),聚类到第1组的沙子空心李数量最多,包含30份沙子空心李种质,第2组最少,共14个种质,第3组和第4组分别有22个及26个种质。92份沙子空心李种质产自4个种植区,然而聚类结果并不呈现出相应的规律性,这可能是由于采样区域地理间隔较小,栽培环境与技术差异较小,株系间基因交流频繁,因而聚类结果不规律。但根据聚类结果,92份沙子空心李种质在遗传相似系数为0.645时可被聚类为4组,这表明供试的沙子空心李种质可能来自4个不同品系。

## 2.6 分子指纹图谱构建

利用18条IRAP引物对92份沙子空心李进行PCR扩增,获得每个引物92个种质的0/1数据矩阵,这些0/1数据可作为供试空心李种质指纹图谱或分子身份证构建的直接依据。为达到利用最少的引物鉴定尽量多种质的目的,通过对有效等位基因数达到2.000的12条IRAP引物的种质鉴别情况进行统计(表5),最终确定核心引物为Ty3-2,其鉴别率最高(90.22%),共能鉴定出83个供试种质,另有9个沙子空心李种质(N10、N16、N35、N36、L26、L27、S2、S6、S7)无法鉴别出来,需与其他引物组合进行鉴别。引物Ty3-6与Ty3-2组成1组核心引物,可鉴别出所有种质,构建高效的指纹图谱。将表1中的4个采样地(沿河县南庄村、黎家寨、十二盘村及孙家寨)分别以数字1、2、3、4表示,同时12条IRAP引物依次以字母“A-L”表示(表5),直接以引物扩增出的0/1数值



M.DL2000 DNA Marker; 数字 1~92 代表 1~92 个种质(编号代表的种质名称见表 1)。M.DL2000 DNA Marker; 1-92 represent 92 germplasm (The number is the same as Table 1).

图 3 引物 Ty3-2 及 Ty3-6 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification results of Ty3-2 and Ty3-6

表 4 IRAP 引物扩增结果统计

Table 4 Statistics of IRAP primer amplification results

IRAP 引物 IRAP primer	扩增位点数 Number of amplified loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点比率/% Percentage of polymorphic loci	观测等位基因数 Number of alleles observed	有效等位基因数 Number of effective alleles	基因多样性指数 Gene diversity index	Shannon 信息指数 Shannon's information index
Ty1-2	8	6	75.0	1.750	1.046	0.041	0.089
Ty1-3	5	4	80.0	1.800	1.064	0.058	0.123
Ty1-6	12	12	100.0	2.000	1.471	0.278	0.422
Ty1-7	13	13	100.0	2.000	1.629	0.367	0.547
Ty1-9	13	13	100.0	2.000	1.560	0.335	0.506
Ty1-15	12	12	100.0	2.000	1.623	0.368	0.551
Ty1-17	6	4	66.7	1.667	1.090	0.077	0.148
Ty1-18	9	8	88.9	1.889	1.647	0.364	0.530
Ty1-20	8	8	100.0	2.000	1.466	0.267	0.407
Ty1-25	10	10	100.0	2.000	1.541	0.317	0.482
Ty3-1	7	7	100.0	2.000	1.276	0.204	0.348
Ty3-2	17	17	100.0	2.000	1.594	0.350	0.526
Ty3-3	16	16	100.0	2.000	1.635	0.379	0.563
Ty3-5	12	12	100.0	2.000	1.477	0.295	0.460
Ty3-6	12	12	100.0	2.000	1.317	0.217	0.361
Ty3-9	9	8	88.9	1.889	1.452	0.276	0.425
Ty3-14	4	3	75.0	1.750	1.203	0.153	0.264
Ty3-16	16	16	100.0	2.000	1.568	0.351	0.532
合计 Total	189	180					
平均 Mean	10.5	10	95.24	1.930	1.426	0.261	0.405

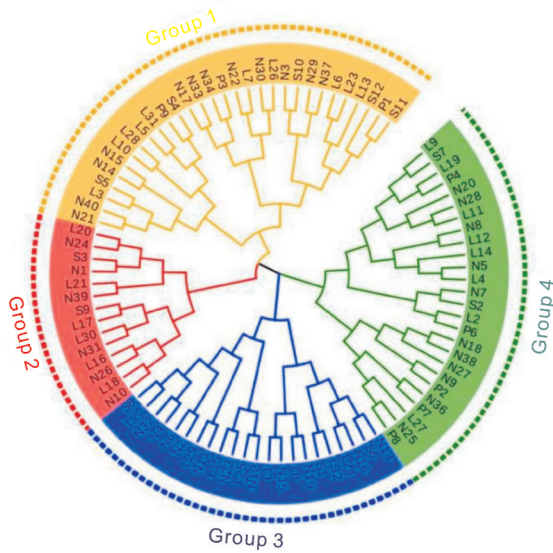


图4 92份沙子空心李聚类结果

Fig.4 Dendrogram of 92 Shazikongxinli germplasms based on IRAP bands

串构建指纹代码。以种质N1和L1为例,N1指纹代码为:1A0100000000110001I000000000101,第1位数字1代表采样地1(沿河县南庄村),A代表IRAP引物Ty3-2,I表示引物Ty3-6;L1指纹代码为:2A01010001010011001I011010000101,第1位数字2代表采样地2(沿河县黎家寨),最终利用每个种质的指纹代码,分别生成包含基本信息的条形码和二维码(图5)。

表5 IRAP引物鉴别供试种质情况

Table 5 The number of germplasms that can be identified by IRAP primers

编号 No.	编码 Code	IRAP引物 IRAP primers	鉴定种质数 Number of germplasm that can be identified	鉴定比率/% Identification ratio
1	A	Ty3-2	83	90.22
2	B	Ty3-3	81	88.04
3	C	Ty3-16	78	84.78
4	D	Ty1-7	69	75.00
5	E	Ty1-15	65	70.65
6	F	Ty1-9	59	64.13
7	G	Ty3-5	48	52.17
8	H	Ty1-6	36	39.13
9	I	Ty3-6	32	34.78
10	J	Ty1-25	28	30.43
11	K	Ty3-1	12	13.04
12	L	Ty1-20	8	8.70

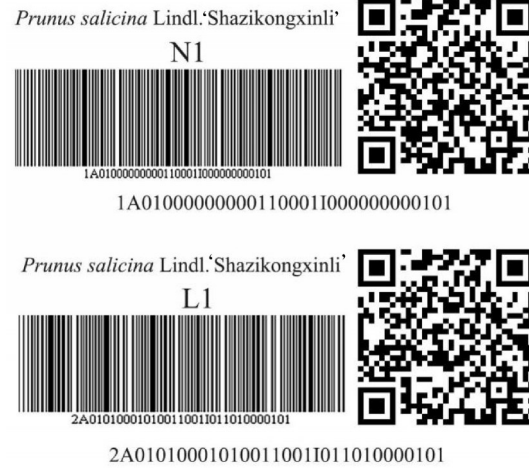


图5 沙子空心李种质N1及L1分子身份证

Fig.5 *Prunus salicina* Lindl. Shazikongxinli N1 and L1 molecular IDs

### 3 讨论

#### 3.1 IRAP体系优化

本研究通过 $L_{16}(4^3)$ 正交试验确定 $10\ \mu\text{L}$ 沙子空心李IRAP-PCR反应的最优体系,经反复试验,认为Mix及IRAP引物含量是影响PCR结果优劣的主要因素。MIX和IRAP引物含量过低时,PCR扩增结果中条带均较少且较为暗淡,易造成试验误差,影响试验结果。但Mix和IRAP引物含量也不可太高,IRAP引物含量过高时,容易导致引物二聚体的产生,同时也会增加导致非特异扩增及错配的可能性<sup>[17]</sup>,而Mix含量太高则会造成本不必要的浪费,达不到经济高效的目的;另外,循环次数也是影响PCR扩增结果的重要因素,循环次数与PCR产物浓度成正比,次数太少易导致产物含量太少,而循环次数太多也会导致非特异性产物的产生,循环次数一般选择30~40次<sup>[18]</sup>。本试验对 $10\ \mu\text{L}$ IRAP-PCR反应体系进行了优化,经济高效地保证了试验结果的准确性。

#### 3.2 指纹图谱构建

目前构建指纹图谱的方法相对较多,有直接根据条带统计获得的“0/1”数据作为构建指纹的代码;还有从多个引物的扩增结果中选取稳定的特异条带组成“0/1”数据构建指纹代码;另外,还可将二进制的“0/1”数据转变为十进制的数字形成代码<sup>[18]</sup>。指纹图谱和分子身份证的构建对于种质鉴别具有重要意义。本研究确定引物Ty3-2及Ty3-6作为种质鉴定及指纹图谱构建的高效标记引物,并据此构建了



供试种质的分子身份证。在构建的分子身份证中加入了种质的相关信息,包括栽培地、突出性状等信息,可为后续沙子空心李育成品种的分子身份证构建及种质知识产权的保护提供参考。

### 3.3 沙子空心李遗传多样性及聚类分析

遗传多样性能够反映出物种的遗传背景及育种潜力,是作物种内和种群之间育种过程的基础条件<sup>[19]</sup>。对沙子空心李种质进行遗传多样性分析,是种质资源鉴定、筛选的重要工作,也是培育优异种质的前提。李作为一种常见果树,对于其遗传多样性的研究相对较多。王红林等<sup>[20]</sup>通过 SSR 标记对 16 份贵州中晚熟李种质进行分析,平均 Shannon 多样性指数( $I$ )为 1.59,认为这些李种质具有丰富的遗传信息,这和魏潇等<sup>[21]</sup>利用 22 对 SSR 引物分析 17 份南方李品种的多样性结果类似( $I=1.709$ )。左力辉等<sup>[22]</sup>也通过 SSR 标记检测了 24 份中国李品种的遗传多样性( $H=0.227\ 3, I=0.358\ 6$ )。陈红等<sup>[23]</sup>则通过 ISSR 标记分析了 48 份李种质的多样性水平,平均 Nei's 遗传多样性指数( $H$ )为 0.345,平均 Shannon 多样性指数( $I$ )0.508。目前对单一李品种内的遗传多样性研究相对较少。Basilio 等<sup>[24]</sup>以 29 份日本李核心种质为研究对象,通过 11 条 ISSR 引物评价其多样性,结果显示平均 Nei's 遗传多样性指数( $H$ )为 0.15,平均 Shannon 多样性指数( $I$ )0.27。这低于本研究通过 18 条 IRAP 引物对 92 份沙子空心李的分析结果( $H=0.261, I=0.405$ )。其可能与本试验采用的分子标记检测能力不同,所收集的种质样本数量多等因素有关。另外,Guan 等<sup>[25]</sup>通过 9 个 IRAP 标记检测了 268 份柿种间和种内的多样性水平( $H=0.240, I=0.389$ ),认为这些柿种质具有较为丰富的遗传信息。本研究验证了反转录转座子标记在李植物遗传多样性分析的适用性,显示 IRAP 标记即使在单一品种中也具有较高水平地检测变异的能力,这可能与反转录转座子在李中分布广泛、在种内也具有丰富的序列和插入多态性等特性有关。在逆境条件下,反转录转座子容易被激活产生新的插入突变,进行横向、纵向传递<sup>[26]</sup>,因而相较于 SSR、ISSR 等标记用于种间系谱的研究,IRAP 标记由于其标记性质,可能更适合用于栽培种内的变异检测<sup>[5]</sup>,分析种内个体水平上的遗传变异情况及亲缘关系。

遗传相似性系数是判断物种间亲缘关系及遗传基础的标准之一<sup>[27]</sup>。本研究通过 neighbor-joining 法对 92 份供试沙子空心李进行聚类分析,在遗传相似

系数为 0.645 时,供试种质被聚类为 4 类。在聚类结果中这些供试种质并不呈现出相应的地理分布规律性,这可能是由于采样的 4 个区域地理间隔较小,种苗来源途径基本相同,栽培环境及技术等相近,同时种质间交流频繁,渗入程度较大。本研究结果确定了供试种质基因水平上的亲缘关系,可为后续选育优异种质中高效选配亲本提供参考依据。

沙子空心李在生产上出现果实品质及成熟期不一致的现象,可能是在长期的栽培过程中,由地方品种的种性退化以及苗木繁育过程中产生的不同品系混杂引起的。本研究验证了沙子空心李种质在 DNA 水平上产生了较为明显的变异,排除了供试沙子空心李不同株系间在栽培表现上产生差异仅由环境因素或栽培技术不同而导致的情况,表明这些种质可作为优异品系培育的核心种质。后续可通过结合各个株系的优良性状包括抗逆能力、果实品质、产量等进行杂交选配,培育出更为优异的后代。如利用沙子空心李种质 N22 具有果实最大的突出品质,结合 N27 果实口感最好和 N7 等种质高产、稳定的优点进行杂交后连续回交繁育后代,实现沙子空心李的增产提质。

### 参考文献 References

- [1] 李刚凤,李洪艳,张绍阳,等.沙子空心李果实营养品质的主成分分析和综合评价[J].食品与发酵工业,2020,46(12):264-270.LI G F, LI H Y, ZHANG S Y, et al. Principal component analysis and comprehensive evaluation of the nutritional quality of *Prunus salicina* Lindl. 'Shazi Kongxinli' fruit[J]. Food and fermentation industries, 2020, 46(12): 264-270 (in Chinese with English abstract).
- [2] 丁健,阮成江,吴茂宏,等.空心李 RNA-seq SSR 信息分析及分子标记开发[J].分子植物育种,2019,17(8):2579-2586.DING J, RUAN C J, WU M H, et al. RNA-seq SSR information analysis and development of molecular markers in Kongxinli[J]. Molecular plant breeding, 2019, 17(8): 2579-2586 (in Chinese with English abstract).
- [3] 韩振诚,潘学军,安华明,等.贵州柿属植物种质资源遗传多样性遗传多样性的 SRAP 分析[J].果树学报,2015,32(5):751-762.HAN Z C, PAN X J, AN H M, et al. Genetic diversity of *Diospyros* Linn. in Guizhou based on SRAP[J]. Journal of fruit science, 2015, 32(5): 751-762 (in Chinese with English abstract).
- [4] 魏潇,章秋平,刘威生.中国李种质资源研究进展[J].园艺学报,2020,47(6):1203-1212.WEI X, ZHANG Q P, LIU W S. Research progress on plum germplasm resources in China[J]. Acta horticulturae sinica, 2020, 47(6): 1203-1212 (in Chinese with English abstract).

- [5] KALENDAR R, GROB T, REGINA M, et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques[J]. Theoretical and applied genetics, 1999, 98: 704-711.
- [6] KALENDAR R, ALAN H S. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1115: 233-255.
- [7] 陈立俊, 蒋奇呈, 李红叶, 等. 基于茶树 *Ty3-gypsy* 逆转录转座子序列的 IRAP 分子标记开发及利用[J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 902-918. CHEN L J, JIANG Q C, LI H Y, et al. Development and application of IRAP molecular markers based on *Ty3-gypsy* transposition sequence in tea plants[J]. Molecular plant breeding, 2022, 20(3): 902-918 (in Chinese with English abstract).
- [8] 刘厚宇, 李顺雨, 吴敏芳, 等. 中国樱桃 (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) IRAP 分子标记技术体系的建立[J]. 种子, 2020, 39(9): 31-35, 40. LIU H Y, LI S Y, WU M F, et al. Establishment of IRAP molecular marker system of *Prunus pseudocerasus* Lindl. [J]. Seed, 2020, 39(9): 31-35, 40 (in Chinese with English abstract).
- [9] 周鹏, 张士伟, 翟锐, 等. 梨 *Ty1-copia* 反转录转座子的克隆及 IRAP 分子标记体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2016, 44(2): 97-104. ZHOU P, ZHANG S W, ZHAI R, et al. Cloning of *Ty1-copia* retrotransposons in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) and establishment of the inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) marker system[J]. Journal of Northwest A & F University (natural science edition), 2016, 44(2): 97-104 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李慧, 罗正荣, 张青林. 基于 SSR 和 IRAP 标记的 '关口葡萄' 亲缘关系分析[J]. 果树学报, 2014, 31(6): 1040-1046. LI H, LUO Z G, ZHANG Q L. Genetic relationship analysis of 'Guankouputao' grape by SSR and IRAP markers[J]. Journal of fruit science, 2014, 31(6): 1040-1046 (in Chinese with English abstract).
- [11] 陶金, 乔光, 文晓鹏, 等. 火龙果 IRAP 分子标记反应体系的建立与优化[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(4): 33-38. TAO J, QIAO G, WEN X P, et al. Establishment and optimization of IRAP marker methodology in dragon fruit[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(4): 33-38 (in Chinese with English abstract).
- [12] 聂琼, 文晓鹏. 火龙果组培苗体细胞无性系变异及其分子检测[J]. 果树学报, 2017, 34(12): 1527-1536. NIE Q, WEN X P. Somaclonal variation of pitaya (*Hylocereus undatus*) *in vitro* plants and identification by molecular markers[J]. Journal of fruit science, 2017, 34(12): 1527-1536 (in Chinese with English abstract).
- [13] 沈玉英, 高志红, 王飞, 等. 梅 (*Prunus mume*) IRAP 分子标记技术体系的建立[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 423-427. SHEN Y Y, GAO Z H, WANG F, et al. A technique system of IRAP marker on mei (*Prunus mume*) [J]. Journal of fruit science, 2011, 28(3): 423-427 (in Chinese with English abstract).
- [14] FAN F H, WENG X P, DING G J, et al. Isolation, identification, and characterization of genomic LTR retrotransposon sequences from masson pine (*Pinus massoniana*) [J]. Tree genetics & genomes, 2013, 9: 1237-1246.
- [15] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis (ver. 1.32) [M]. Alberta: Molecular Biology and Biotechnology Centre, 1997.
- [16] ROHIF F J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. exeter software [CP]. Setauket, New York: Applied Biostatistics Inc., 1998.
- [17] 刘昕. 萱草属植物遗传多样性的 ISSR 分析及指纹图谱的初步构建[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014. LIU X. Genetic diversity analysis of ISSR and fingerprint preliminary construction of the genus *Hemerocallis* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [18] 桂腾琴, 李春艳, 秦燕, 等. 应用 ISSR 分子标记绘制黔西南州梨品种 DNA 的指纹图谱[J]. 种子, 2021, 40(11): 126-131. GUI T Q, LI C Y, QIN Y, et al. DNA fingerprinting of pear varieties in Qianxinan prefecture based on ISSR molecular markers [J]. Seed, 2021, 40(11): 126-131 (in Chinese with English abstract).
- [19] WEI X, SHEN F, ZHANG Q P, et al. Genetic diversity analysis of Chinese plum (*Prunus salicina* L.) based on whole-genome resequencing [J/OL]. Tree genetics & genomes, 2021, 17: 26 [2022-08-30]. <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01506-x>.
- [20] 王红林, 陈守一, 罗昌国, 等. 利用 SSR 标记分析贵州中晚熟李资源遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2022, 20(4): 1230-1238. WANG H L, CHEN S Y, LUO C G, et al. Genetic diversity analysis of Guizhou middle-late maturing plums by SSR markers [J]. Molecular plant breeding, 2022, 20(4): 1230-1238 (in Chinese with English abstract).
- [21] 魏潇, 章秋平, 刘宁, 等. 不同来源中国李 (*Prunus salicina* L.) 的多样性与近缘种关系[J]. 中国农业科学, 2019, 52(3): 568-578. WEI X, ZHANG Q P, LIU N, et al. Genetic diversity of the *Prunus salicina* L. from different sources and their related species [J]. Scientia agricultura sinica, 2019, 52(3): 568-578 (in Chinese with English abstract).
- [22] 左力辉, 韩志校, 梁海永, 等. 不同产地中国李资源遗传多样性 SSR 分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(1): 111-118. ZUO L H, HAN Z X, LIANG H Y, et al. Analysis of genetic diversity of *Prunus salicina* from different producing areas by SSR markers [J]. Acta horticulturae sinica, 2015, 42(1): 111-118 (in Chinese with English abstract).
- [23] 陈红, 杨逸然. 贵州李资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 果树学报, 2014, 31(2): 175-180. CHEN H, YANG Y R. Genetic diversity and relationship of plum resources in Guizhou analysed by ISSR markers [J]. Journal of fruit science, 2014, 31(2): 175-180 (in Chinese with English abstract).
- [24] BASILIO C, CAROLE D, MARIO M, et al. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers [J]. Cienciae investigacion agraria,

- 2012, 39(3): 533-543.
- [25] GUAN C F, CHACHAR S, ZHANG P X, et al. Inter- and intra-specific genetic diversity in diospyros using SCoT and IRAP markers[J]. Horticultural plant journal, 2020, 6(2): 71-80.
- [26] 王利英, 杜永臣, 张斌, 等. 茄子 IRAP 和 REMAP 分子标记的开发[J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1363-1367. WANG L Y, DU Y C, ZHANG B, et al. Development of molecular markers IRAP and REMAP in eggplant[J]. Acta horticulturae sinica, 2008, 35(9): 1363-1367 (in Chinese with English abstract).
- [27] 马凯, 赵钰, 张恒, 等. 基于 SSR 标记的中亚生态区核桃 (*Juglans regia* L.) 遗传多样性与种群结构分析[J]. 果树学报, 2021, 38(11): 1854-1867. MA K, ZHAO Y, ZHANG H, et al. Analysis of genetic diversity and population structure of walnut (*Juglans regia* L.) in central Asia ecological region based on SSR markers [J]. Journal of fruit science, 2021, 38(11): 1854-1867 (in Chinese with English abstract).

## Evaluation of genetic diversity and construction of DNA fingerprint of *Prunus salicina* Lindl. ‘Shazikongxinli’ based on IRAP markers

WANG Gui<sup>1</sup>, LI Ruirui<sup>1</sup>, WU Maohong<sup>2</sup>, REN Feihong<sup>3</sup>, WANG Lili<sup>4</sup>, QIAO Guang<sup>1</sup>

1. The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountain Region (Ministry of Education) / College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Tongren Academy of Forestry, Tongren 554300, China;
3. Tongren Academy of Agricultural Sciences, Tongren 554300, China;
4. Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

**Abstract** Ninety-two accessions of ‘Shazikongxinli’ germplasm with elite traits were selected by visiting and surveying to evaluate the genetic diversity of *Prunus salicina* Lindl. ‘Shazikongxinli’ IRAP primers were developed based on the conserved regions of RT sequences of plum reverse transcription transposons Ty1-copia and Ty3-gypsy.  $L_{16}(4^3)$  orthogonal experiments were designed to optimize the main factors affecting content of IRAP-PCR with 10  $\mu\text{L}$  volume. 18 IRAP primers were used to analyze the genetic diversity and construct the fingerprint of the germplasm tested. The results showed that the optimized 10  $\mu\text{L}$  IRAP-PCR reaction system was 1.3  $\mu\text{L}$  of 5-10 mol/L IRAP primers, 5.0  $\mu\text{L}$  of PCR mixture, 1.0  $\mu\text{L}$  of template DNA (30 ng/ $\mu\text{L}$ ), and the number of PCR cycles was 40 times. A total of 189 loci were amplified from 18 IRAP primers with good repeatability and high polymorphism, including 180 polymorphic loci. The average value of observed number of alleles ( $N_a$ ), effective number of alleles ( $N_e$ ), Nei’s gene diversity ( $H_e$ ) and Shannon’s information index ( $I$ ) for all primers was 1.930, 1.426, 0.261 and 0.405, respectively. The 92 accessions tested were clustered into 4 groups using the neighbor-joining method. The IRAP primers Ty3-2 and Ty3-6 were identified as core primers, which can be used to efficiently construct the fingerprints of 92 accessions tested.

**Keywords** *Prunus salicina* Lindl. ‘Shazikongxinli’; germplasm; molecular marker; IRAP; fingerprinting; genetic diversity; germplasm innovation

(责任编辑: 张志钰)