

## 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析

高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 斯金平\*

浙江农林大学 生物技术实验室, 浙江 临安 311300

**摘要:**目的 对栝楼的遗传多样性进行分析, 旨在为栝楼的遗传育种中亲本的组配奠定基础。方法 采用 ISSR 分子标记法对采自不同种植地区的 34 份栝楼种质进行多态性和聚类分析。结果 不同种植地区的栝楼的遗传多态性可达 90.0%; 根据 ISSR 聚类结果可将 34 份栝楼种质分为食籽用型、药食两用型和野生型 3 大类群。结论 栝楼种质之间存在着较高的遗传多样性, 与种植地区没有相关性。

**关键词:** 栝楼; ISSR; 多态性; 聚类分析; 遗传多样性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0363-04

## Analysis on genetic diversity of *Trichosanthes kirilowii* based on ISSR

GAO Yan-hui, LI Hui-hui, ZHU Yu-qiu, SI Jin-pin

Laboratory of Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

**Abstract: Objective** In order to provide the foundation for the genetics and breeding of *Trichosanthes kirilowii*, the genetic diversity of *T. kirilowii* was analyzed. **Methods** Studies on polymorphism and cluster on 34 *T. kirilowii* materials from different growing areas were done by inter-simple sequence repeat (ISSR). **Results** The genetic polymorphism of *T. kirilowii* was up to 90% from different growing areas. According to the results of ISSR cluster, the materials of *T. kirilowii* were divided into three classes: food seed, edible and medicinal, and wild types. **Conclusion** There is higher genetic polymorphism among *T. kirilowii* materials, and no correlation to the growing areas.

**Key words:** *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; inter-simple sequence repeat (ISSR); polymorphism; cluster analysis; genetic diversity

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 又名瓜蒌、天瓜等, 是葫芦科多年生宿根攀援草本植物, 分布于东亚及澳大利亚北部, 在我国主要分布在浙江、安徽、山西、河南、江西等省<sup>[1-2]</sup>。栝楼具有药食两用功能, 作为中药在我国有着悠久的历史, 具有很高的综合开发价值和经济价值。目前, 栝楼的研究主要集中在高效栽培技术、病虫害防治、种苗繁育、贮藏加工、天花粉蛋白医药功能等研究<sup>[3-4]</sup>。

由于栝楼是雌雄异株植物, 长期异花授粉和栽培选择导致产区出现了很多植物类型, 给栝楼产业的规模化生产带来很多问题。黄璐琦等<sup>[5]</sup>曾利用经典的形态分类学, 辅以细胞学、孢粉学、组织学以及分子生物学方法, 对世界范围栝楼属植物中的种间及属下类群分划进行研究。王敏等<sup>[6]</sup>、宁志怨等<sup>[7]</sup>利用 RAPD 分子标记对栝楼的遗传多样性以及亲缘

关系进行研究分析, 但其取材范围较窄, 不能为全面地分析栝楼的遗传育种提供更多的信息。

ISSR 分子标记除具有经济、简单和易操作等优点外, 还具有比 RAPD 更高可重复性及稳定性的特点。近年来, ISSR 分子标记已被广泛应用于药用植物的亲缘关系、品种鉴定和遗传多样性等研究<sup>[8-12]</sup>。为此, 本研究收集浙江省的农家品种以及少量省外资源共 34 份, 运用 ISSR 标记对其进行分子生物学分析, 以期对现有资源的遗传多样性做进一步研究, 为栝楼植物资源的收集、鉴定、保护和育种等提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

2008 年 8 月至 10 月收集全国栝楼主产区栝楼果实与植物标本 (表 1), 经浙江农林大学李根有教

收稿日期: 2010-05-28

基金项目: 浙江省科技厅资助项目 (2008C32012)

作者简介: 高燕会 (1974—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物遗传育种与生物技术。

\* 通讯作者 斯金平 Tel: 13868004019 E-mail: lssjp@163.com

表 1 栝楼材料的来源与主要形态特征

Table 1 Origin of *T. kirilowii* and main characteristics

序号	来源	主要形态特征	类型
1	浙江长兴	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒长, 小, 褐色, 表面粗糙	食籽型
2		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽椭圆, 饱满, 褐色	食籽型
3		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒椭圆, 褐色, 饱满	食籽型
4		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒椭圆, 较小, 褐色	食籽型
5		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒椭圆, 饱满, 褐色	食籽型
6		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒长, 大, 饱满	食籽型
7		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽粒较长, 小, 褐色	食籽型
8		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色	食籽型
9		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽椭圆, 饱满, 褐色, 籽粒较小	食籽型
10		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽椭圆, 饱满, 褐色, 表面粗糙	食籽型
11	浙江平湖	叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽粒大, 椭圆, 深褐色	药食两用
12		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽粒椭圆, 褐色	药食两用
13		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽粒特大, 椭圆, 深褐色	药食两用
14		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽椭圆, 有花纹, 褐色, 带绒毛	药食两用
15		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽较长, 有花纹, 褐色	药食两用
16		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽椭圆, 饱满, 褐色	药食两用
17		叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿, 叶大油亮光滑, 果肉黄色, 籽长大, 褐色	药食两用
18	浙江庆元	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色	食籽型
19		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色, 表面粗糙	食籽型
20		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色	食籽型
21	浙江平湖	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黄色, 籽粒椭圆, 光滑, 褐色	药食两用
22		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黄色, 籽椭圆, 饱满, 表面粗糙, 褐色	药食两用
23	安徽岳西	叶卵状心形边缘具疏齿, 浅裂, 果肉黄色, 籽粒特小, 不饱满, 褐色	野生型
24		叶裂片菱状心形稍圆边缘具疏齿, 叶小, 果肉黄色, 籽椭圆, 扁, 褐色, 有毛	药食两用
25		叶裂片菱状心形稍圆边缘具疏齿, 叶小, 果肉黄色, 籽椭圆, 稍大, 褐色, 有毛	药食两用
26		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黄色, 籽粒长, 黄褐色	药食两用
27		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黄色, 籽粒长, 深褐色	药食两用
28	浙江建德	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色	食籽型
29		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽长, 褐色	食籽型
30	河南舞钢	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黑色, 籽椭圆, 褐色	食籽型
31		叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 锐尖, 深裂, 果肉黄色, 籽椭圆, 褐色	药食两用
32	山西运城	叶裂片菱状心形稍圆边缘具疏齿, 叶不油亮光滑, 果肉黄色, 籽粒圆, 饱满, 浅褐色	药食两用
33	江西	叶裂片菱状心形边缘具疏齿, 叶小, 果肉黄色, 籽粒长, 干瘪, 褐色	药食两用
34	山西新降	叶裂片菱状心形稍圆边缘具疏齿, 叶不油亮光滑, 果肉黄色, 籽粒圆, 饱满, 浅褐色	药食两用

授鉴定为葫芦科栝楼属栝楼 *T. kirilowii* Maxim.。2009 年 2 月在浙江农林大学试验基地播种, 2009 年 5 月取栝楼的新鲜嫩叶用于 DNA 提取。

## 1.2 方法

**1.2.1 栝楼基因组 DNA 的提取** 采用改良 CTAB 法提取栝楼基因组 DNA<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 ISSR 引物筛选及 PCR 扩增** 根据加拿大哥伦比亚大学公布的标准引物序列, 由金思特科技(南京)有限公司合成 100 条引物, 根据李慧慧等<sup>[11]</sup>构建的栝楼 ISSR-PCR 反应体系: 20  $\mu$ L PCR 反应体积中含 1.0 $\times$ Buffer, 30 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mmol/L dNTPs, 0.5  $\mu$ mol/L 引物, 0.5 U *Taq*

聚合酶；ISSR-PCR 的反应程序为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 2 min，35 个循环；72 °C 延伸 7 min；4 °C 保存。对 100 条引物进行初筛和复筛，ISSR-PCR 扩增的反应产物用 1%（含 0.5 mg/L EB）琼脂糖凝胶电泳分离，在 4 V/cm 下电泳 1.5 h 后，在紫外凝胶成像系统（Bio-Rad 公司）观察照相并记录结果。

**1.2.3 数据统计与分析** 由于 ISSR 是显性标记，按照相同迁移位上有带（显性）记为“1”、无带（隐隆）记为“0”，强带和弱带的赋值均为“1”，形成“0/1”矩阵。对于多态性位点，仅在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析，用 SPSS16.0 软件中的 Jaccard 方法计算样品间的遗传相似系数（genetic similarity, GS），用 Analyze 菜单中的 classify 中 hierarchical cluster 进行数据分析。

**2 结果与分析**

**2.1 栝楼 ISSR-PCR 扩增产物的多态性分析**

通过对 100 条 ISSR 引物进行初筛和复筛得到多态性高、重复性好的 15 条引物进行统计分析（表 2）。随机选取的引物 UBC881 扩增的结果见图 1。

结果表明，15 条 ISSR 随机引物共扩增出 112 条带，其中 101 条带具有多态性，占总扩增带数的

表 2 15 条 ISSR 引物的 PCR 扩增结果  
Table 2 PCR amplification of 15 ISSR primers

引物	5'-3'DNA 片段	DNA 谱带数	多态性条带数	多态性条带比例/%
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T	5	5	100
UBC808	(AG) <sub>8</sub> C	8	8	100
UBC815	(CT) <sub>8</sub> G	9	9	100
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	5	5	100
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC	7	3	43
UBC836	(AG) <sub>8</sub> YA	9	8	89
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	9	9	100
UBC844	(CT) <sub>8</sub> RC	7	6	86
UBC879	(CTTCA) <sub>3</sub>	7	7	100
UBC880	(GGAGA) <sub>3</sub>	10	9	90
UBC881	(GGGGT) <sub>3</sub>	12	2	100
UBC887	DVD(TC) <sub>7</sub>	7	6	86
UBC888	BDB(CA) <sub>7</sub>	8	8	100
UBC890	VHV(GT) <sub>7</sub>	7	5	71
UBC891	HVH(TG) <sub>7</sub>	7	6	86
总计		112	101	
平均		7.4	6.7	90

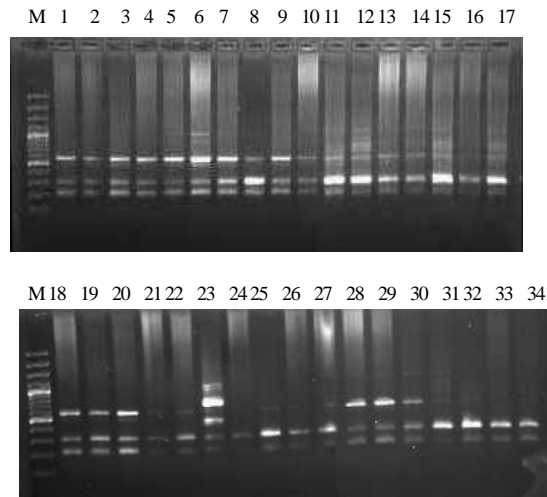


图 1 引物 UBC881 对栝楼基因组 DNA 的 ISSR 扩增图谱  
Fig. 1 Amplification fingerprint of primer UBC881 on genetic DNA of *T. kirilowii*

90%，说明供试栝楼之间具有丰富的遗传多态性。各引物扩增的 DNA 带数在 5~12 条，平均每条引物扩增出 7.4 个位点，每个引物平均检测 6.7 条 ISSR 多态性条带。引物多态性最高的是 UBC879、UBC807、UBC808、UBC815、UBC834、UBC840、UBC881、UBC888 为 100%，多态性最低的是 UBC835 为 43%。说明 ISSR 标记在检测栝楼基因组遗传多态性上有较显著的检出效率。

**2.2 聚类分析**

根据 SPSS16.0 结果计算供试的 34 个栝楼样品间的遗传相似系数为 0.500 0~0.938 1。遗传距离为 0.017 1~0.522 2。总体上看，由于扩增条带的多态性较高，各样品间的遗传相似系数相对较高。安徽野生栝楼和食籽型以及药食两用栝楼的遗传基础相距较远。

通过对 34 个栝楼样品进行聚类分析，结果见图 2。供试的栝楼样品可分为 3 大类群，第 1 类群来自浙江长兴、庆元，属于食籽型栝楼，其苗期性状表现为叶裂片菱状心形边缘具疏齿，锐尖，深裂，果实成熟时果肉黑色，籽椭圆，饱满，褐色；第 2 类群来自浙江平湖、浙江建德、安徽、河南、江西、山西，属于药食两用型的栝楼，其苗期性状表现为：叶裂片菱状卵状心形稍圆边缘具疏齿，叶大油亮光滑，果实成熟时果肉黄色，籽粒特大，椭圆，深褐色。第 3 类群包括安徽野生的栝楼，叶卵状心形边缘具疏齿，浅裂，果实成熟时果肉黄色，籽粒特小，不饱满，褐色。聚类分析结果表明，食籽型栝楼的

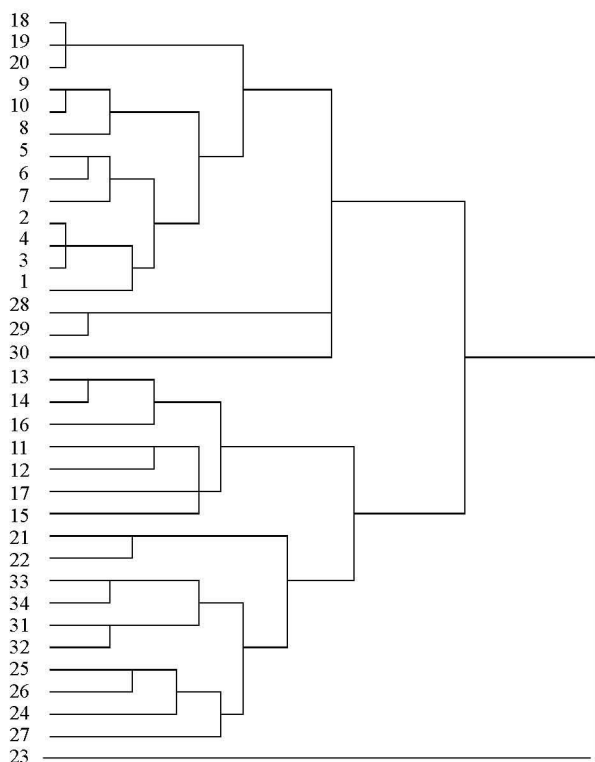


图 2 34 份供试材料的聚类结果

Fig. 2 Dendrogram of ISSR in 34 *T. kirilowii* materials

遗传关系较近, 而药食两用型的栝楼也具有较近的遗传关系, 与传统的栝楼的分类结果一致。

### 3 结论与讨论

遗传多样性是生物多样性研究的核心, 可以反映出物种的遗传背景、育种潜力和利用价值, 对优质种质的保护和发掘利用具有重要意义。栝楼在长期的野生或栽培条件下, 由于环境差异、常异花受粉及种子繁殖等原因, 形成了众多野生及栽培类型, 分析它们之间的遗传差异将有助于其遗传改良。

ISSR 分子标记技术能有效揭示不同种植地区的栝楼资源多样性和亲缘关系, 其多态性比率为 90%。供试材料间的聚类结果与传统的分类结果基本一致, 与地域无明显相关性, 这可能是由于各种种植地区之间种质交换的结果。

本研究对不同种植地区的栝楼种质的 ISSR 分子标记聚类结果表明, 34 份栝楼种质分为 3 大类群 3 小组, 各种食籽型的栝楼聚为一类, 而各种药食两用的栝楼材料聚为一类, 安徽野生型的为一类, 栝楼的亲缘关系和地域关系不密切, 说明不同的种植地区没有相关性, 栝楼在育种过程中亲本组配没有受到地域的限制, 在杂交育种工作中可以充分利用各地的优良种质进行亲本组配, 为栝楼种质资源的全面、有效利用提供依据, 并且对栝楼的选育及品种的改良提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] 郭庆梅, 周凤琴, 李定格, 等. 瓜蒌的名称、原植物和产地的本草考证 [J]. 中医研究, 2006, 19(3): 28-29.
- [2] 黄璐琦, 杨滨, 乐崇熙. 栝楼属药用植物资源调查 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(4): 195-196.
- [3] 张洁, 周立人, 李德庆. 栝楼遗传育种及种质鉴定的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6223-6224.
- [4] 陈惠, 梁倩华. 栝楼组织培养中植株再生的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(12): 737-740.
- [5] 黄璐琦, 乐崇熙, 杨滨, 等. 栝楼属(*Trichosanthes* L.)的系统学研究 [J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(2): 75-78.
- [6] 王敏, 黄璐琦, 付桂芳. 栝楼 3 个农家品种间亲缘近似关系的 RAPD 分析 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(6): 336-227.
- [7] 宁志怨, 董玲, 陈静娴, 等. 栝楼种质资源亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(4): 560-563.
- [8] 罗群, 马丹炜, 王跃华. 川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1554-1557.
- [9] 张春平, 何平, 何俊星, 等. ISSR 分析标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1519-1522.
- [10] 杨生超, 文国松, 刘雪玲, 等. 灯笼花种质资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1523-1527.
- [11] 吕琳, 秦民坚, 贺丹霞, 等. 不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(1): 7-12.
- [12] 李慧慧, 朱玉球, 斯金平, 等. 栝楼 ISSR-PCR 体系的正交优化 [J]. 生物技术, 2009, 19(6): 38-41.