

## 秦皇岛产柽柳 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建

杨晴<sup>1</sup>, 杨菲<sup>2</sup>, 杨康<sup>1</sup>, 曹书敏<sup>2</sup>, 方丛丛<sup>1</sup>, 贾雪莹<sup>2</sup>, 杨俊明<sup>2\*</sup>

1. 河北科技师范学院生命科技学院, 河北 秦皇岛 066600

2. 河北科技师范学院园艺科技学院, 河北 秦皇岛 066600

**摘要:** **目的** 研究河北省秦皇岛市柽柳居群遗传多样性和亲缘关系, 也为柽柳的杂交育种和个体鉴定提供依据。**方法** 采用 ISSR 分子标记技术, 以白花柽柳、松柏柽柳和刚毛柽柳为对照研究秦皇岛 29 份柽柳的遗传多样性。**结果** 筛选的 9 条 ISSR 引物扩增出 114 个 DNA 位点, 110 个多态位点, 占总位点的 96.49%。32 份柽柳的平均有效等位基因数为 1.543 7, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.320 3, 平均 Shannon 信息指数为 0.484 2。基于 ISSR 分子标记数据建立的 UPGMA 亲缘关系聚类图, 32 份柽柳在遗传距离 28.79 处将 32 份柽柳分成 2 大类群; 同时利用多态性 ISSR 引物构建 32 份柽柳的分子指纹图谱。**结论** 秦皇岛柽柳遗传多样性非常丰富, ISSR 分子标记技术可以有效地用于柽柳资源评价和指纹图谱构建。

**关键词:** 柽柳; PCR; ISSR; 遗传多样性; 指纹图谱

**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)02-0363-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.024

## Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint on *Tamarix chinensis* from Qinhuangdao by ISSR

YANG Qing<sup>1</sup>, YANG Fei<sup>2</sup>, YANG Kang<sup>1</sup>, CAO Shu-min<sup>2</sup>, FANG Cong-cong<sup>1</sup>, JIA Xue-ying<sup>2</sup>, YANG Jun-ming<sup>2</sup>

1. College of Life Sciences and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066600, China

2. College of Horticulture Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066600, China

**Abstract: Objective** To study the genetic diversity and phylogenetic relationship on *Tamarix chinensis* of Qinhuangdao in Hebei province, and to establish their DNA fingerprints, which will provide some guidance for crossbreeding and cultivar identification of *T. chinensis*. **Methods** Inter-simple sequence repeat (ISSR) was conducted to assess the genetic diversity of 32 *T. chinensis* individuals and the DNA fingerprints were established by Popgene software. **Results** Nine ISSR primers produced 114 loci, of which 110 were polymorphisms, and the percentage of polymorphic loci was up to 96.49% among 32 individuals. The average value of the effective number of alleles, Nei's genetic diversity and Shannon's information index were 1.543 7, 0.320 3, and 0.484 2, respectively. Based on the unweighted pari group method with arithmetic average (UPGMA) and ISSR molecular markers, the 32 *T. chinensis* were divided into two groups at the genetic distance of 28.79. In addition, the DNA fingerprints for 32 individuals were established by polymorphic ISSR primers. There existed abundant genetic diversity among 32 individuals. ISSR molecular markers could be effectively used in genetic diversity and fingerprint analysis for *T. chinensis*.

**Key words:** *Tamarix chinensis* Lour; PCR; ISSR; genetic diversity; fingerprint

柽柳 *Tamarix chinensis* Lour. 喜生于河流冲积平原、海滨、滩头、潮湿盐碱地和沙荒地。柽柳味甘、辛、性平, 归肺、胃、心经, 具有解热、镇痛<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2]</sup>和保肝<sup>[3]</sup>之功效。主治风湿痹痛、麻疹不透<sup>[4]</sup>, 柽柳为温带及亚热带树种, 产于中国甘肃、河北、

河南、山东、湖北、安徽、江苏、浙江、福建、广东、云南等省区, 黄河流域及沿海盐碱地多有栽培。前人的研究主要集中在柽柳药用价值<sup>[5-6]</sup>、入侵能力和入侵特性<sup>[7-10]</sup>。例如通过比较欧亚本地柽柳和美国入侵柽柳的 *PepC* 基因, Gaskin 等<sup>[11]</sup>发

收稿日期: 2016-09-07

基金项目: 国家林业科技支撑计划项目(2009BADB2B0105); 中央财政支持项目[(2015) 005]; 河北省科技厅项目(10225520)

作者简介: 杨晴, 硕士, 主要从事中草药种质资源研究。Email: yangqingxy@163.com

\*通信作者 杨俊明, 博士, 主要从事园林植物资源研究。Email: yjmmail@126.com

现怪柳的草本植物特性和种间杂交是怪柳作为入侵植物的原因之一。Cui 等<sup>[12]</sup>发现怪柳的株高和直径与土壤含盐量呈负相关。蒋志敏等<sup>[13]</sup>和赵景奎等<sup>[14]</sup>分别采用 ISSR 和 RAPD 分子标记技术对黄河三角洲怪柳居群的遗传多样性进行了分析,认为该地区怪柳遗传多样性主要来自种群内。秦皇岛市位于河北省东北部,东经 118°33'~119°51',北纬 39°24'~40°37'。东北接辽宁省绥中县,西北临河北省承德市,西靠唐山市的滦县、迁安,南临渤海。秦皇岛市浅水湾作为怪柳的自然基因宝库,在维持自身的生态平衡以及植物资源的种质保护上都具有极其重要的价值。秦皇岛沿海地区存在大量的天然怪柳林,本课题组在秦皇岛发现了高 9.6 m,直径 22.4 cm 的

怪柳,但未见关于本地区居群怪柳遗传多样性的相关报道。鉴于此,本研究利用 ISSR 分子标记,对秦皇岛怪柳的遗传多样性和居群内的分化水平进行研究,其成果为深入了解秦皇岛怪柳种质资源和制定合理有效的湿地生态系统保护策略提供必要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究的怪柳试材共 32 份,由河北科技师范学院杨俊明教授鉴定。其中 28 份采自秦皇岛浅水湾地区海滨(从浅水湾到金屋浴场),以白花怪柳、松柏怪柳和刚毛怪柳为对照,中华怪柳采自河北科技师范学院,具体样品信息见表 1。

表 1 供试 32 份怪柳品种(系)名称、编号和产地

Table 1 Names, codes, and places of 32 cultivars (strains) used in study

编号 品种(系)	采集地	编号 品种(系)	采集地	编号 品种(系)	采集地
1 密 1	秦皇岛西南木栈道西	12 密 4-2	秦皇岛西南木栈道西	23 ·2-1	秦皇岛西南木栈道西
2 密 2	秦皇岛西南木栈道西	13 密 4-3	秦皇岛西南木栈道西	24 ·2-2	秦皇岛西南木栈道西
3 密 5	秦皇岛中段木栈道西	14 密 4-4	秦皇岛西南木栈道西	25 ·2-3	秦皇岛西南木栈道西
4 密 6	秦皇岛东北木栈道西	15 密 4-5	秦皇岛西南木栈道西	26 滨海翠	秦皇岛西南木栈道西
5 密 7	秦皇岛东北木栈道西	16 密 4-6	秦皇岛西南木栈道西	27 短 3	秦皇岛西南木栈道西
6 密 0-1	秦皇岛西南木栈道东	17 密 4-7	秦皇岛西南木栈道西	28 金屋壮号	秦皇岛东北木栈道西
7 密 0-2	秦皇岛西南木栈道东	18 ·3	秦皇岛东北木栈道西	29 白花怪柳	新疆
8 密 0-3	秦皇岛西南木栈道东	19 ·4	秦皇岛东北木栈道西	30 松柏怪柳	山东
9 密 0-4	秦皇岛西南木栈道东	20 ·6	秦皇岛东北木栈道西	31 刚毛怪柳	新疆
10 密 0-5	秦皇岛西南木栈道东	21 ·7	秦皇岛东北木栈道西	32 中华怪柳	河北科技师范学院实验站
11 密 4-1	秦皇岛西南木栈道西	22 ·8	秦皇岛东北木栈道西		

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取及检测** 采用高盐低 pH 值法提取 DNA<sup>[15]</sup>,用酶标仪检测  $A_{260}/A_{280}$  均在 1.8 左右,表明 DNA 提取纯度较高。

**1.2.2 ISSR-PCR 分析** 首先从加拿大 British Columbia 大学公布的 100 条引物中筛选出 9 条稳定性好、多态性丰富的引物(表 2),对 32 份怪柳材料进行扩增。引物、2xEs Taq MasterMix(含染料)以及 2000DL DNA Marker 均购自上海赛百盛基因技术有限公司。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 2xEsTaq Master Mix 12.5  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol/L 引物 1.0  $\mu$ L, 模板 DNA 50 ng/mL 2  $\mu$ L, RNase-Free Water 4.5  $\mu$ L。扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 每个引物在合适的退火温度(表 2)下退火 1 min, 72

$^{\circ}$ C 延伸 10 min, 30 个循环, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增反应在美国 Bio-Rad 公司生产的 T100 型 PCR 扩增仪上进行,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

**1.2.3 数据分析** 根据 PCR 扩增产物的电泳结果,人工读带,在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为“1”,无 DNA 条带的记为“0”,从而生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。用 POPGEN32 软件进行显性分析与聚类分析<sup>[16]</sup>。参照刘新龙等<sup>[17]</sup>的方法构建 32 份怪柳的 DNA 指纹图谱。

**1.2.4 扩增产物相对分子质量估计** 根据 Marker 片段大小的对数值与电泳迁移距离绘制出 DNA 相对分子质量标准曲线图,然后用直尺量出每个扩增片段在胶板上的迁移距离,依据 DNA 相对分子质量标准曲线图计算出每个片段的相对分子质量。

表 2 用于分析柞柳遗传多样性的 ISSR 引物及扩增结果

Table 2 ISSR primers used in analysis of genetic diversity of *T. chinensis* and their amplification results

引物编号	引物序列	退火温度/°C	扩增条带数	多态性条带	
				数量	占比/%
810	GAGAGAGAGAGAGAT	52.0	16	16	100.00
811	GAGAGAGAGAGAGAC	46.9	12	12	100.00
818	CACACACACACACAG	51.7	12	12	100.00
823	TCTCTCTCTCTCTCC	49.5	16	15	93.75
824	TCTCTCTCTCTCTCG	50.0	11	11	100.00
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	49.1	14	13	92.86
873	GACAGACAGACAGACA	49.5	7	6	85.71
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	50.8	15	14	93.33
880	GGAGAGGAGGAGGAGA	50.3	11	11	100.00
总数		—	114	110	—
平均		—	12.67	12.22	96.49

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物扩增多态性分析

9 条引物共扩增出 114 个 DNA 位点，其中 110 个位点具有多态性，占总位点的 96.49%，说明 32 份柞柳遗传多样性非常丰富。每条引物可以产生 7~15 个 DNA 扩增片段，平均每条引物可以产生 12.67 个扩增片段和 12.22 个多态性扩增片段。834 引物在 32 份柞柳中的扩增图谱见图 1。

2.2 遗传多样性分析

由 POPGEN32 分析显示，32 份柞柳的平均观察等位基因数 1.982 5，平均有效等位基因数 1.543 7，平均 Nei's 基因多样性指数 ( $H$ ) 0.320 2，平均 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 0.484 2，其中有效等位基因最大值为 2.000 0，最小值为 0， $H$  最大值为 0.500 0，最小值为 0， $I$  最大值为 0.693 1，最小值为 0。说明秦皇岛柞柳居群内个体遗传多样性十分丰富。

2.3 聚类分析

以 32 份柞柳和 114 个遗传位点的谱带数据为原始矩阵，基于遗传距离的聚类分析表明，在遗传距离 28.79 处将 32 份柞柳分成 2 大类(图 2)，第 1 类包括的柞柳的编号分别是 1~3、5~29、31~32，共 30 份柞柳。第 2 类是 4 和 30 号柞柳共 2 份柞柳。第 1 类在遗传距离 26.47 处再进一步分成 2 个亚类，第 1 个亚类的柞柳编号是 1~3、5~29 和 32 共 29 份柞柳；第 2 个亚类只有编号是 31 的刚毛柞柳。

2.4 特异标记与指纹图谱构建

通过对 32 份柞柳材料的 ISSR 扩增图谱分析，引物 810 对 22 号柞柳扩增出 2 953 bp 左右的特异性条带。引物 818 对 11 号柞柳扩增出 238 bp 左右的特异性条带。引物 824 对 10 号柞柳扩增出 385 bp 左右的特异性条带。这些特异性条带可以作为柞柳品种鉴定的分子依据。

15 14 13 12 11 10 9 7 6 5 28 22 21 20 19 17 16 4 3 2 1 M 26 27 25 24 23 18 8 29 30 31 32

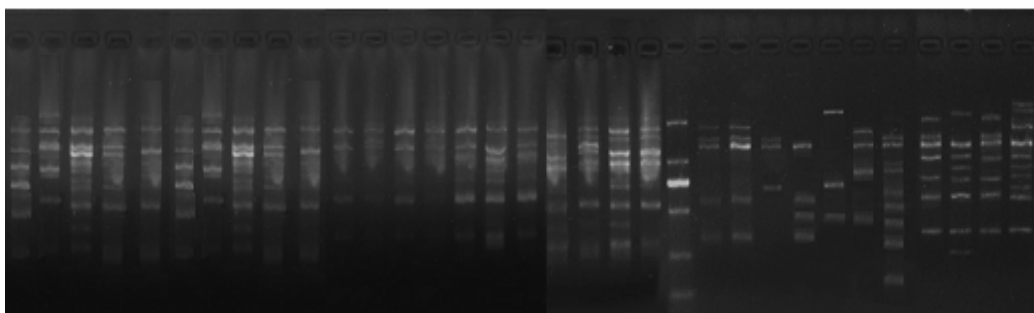


图 1 834 引物在 32 份柞柳中的扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification of 32 plant samples from *T. chinensis* using primer 834

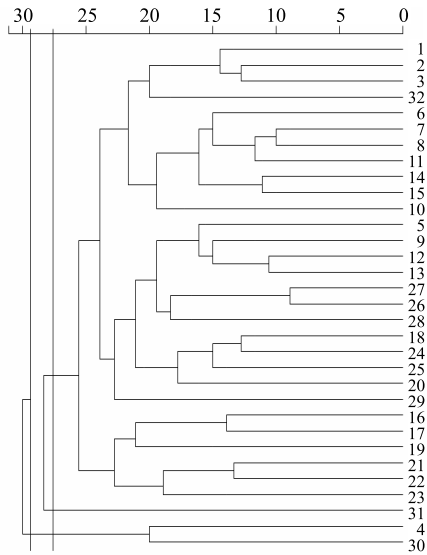


图 2 32 份怪柳的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 32 samples in *T. chinensis*

通过对 32 份怪柳 ISSR 扩增图谱分析, 从筛选出的 9 条引物中又挑选出引物 834, 其扩增出 14 个多态位点, 除 26 号怪柳滨海翠与 27 号怪柳短 3 的指纹图谱一致外, 其他怪柳的谱带都不相同。由此可见, 引物 834 可以将 31 份怪柳全部区分开。从而建立了 32 份怪柳的分子指纹图谱 (图 3)。

### 3 讨论

在物种的进化中遗传多样性起着重要的作用。物种的适应性和新物种的出现依赖于丰富的遗传多样性。高水平的遗传多样性群体被认为是健康的适应性强的群体<sup>[18]</sup>。本研究中 9 条 ISSR 引物共在 32 份怪柳中扩增出 114 个 DNA 位点, 其中 112 个位点具有多态性, 占总位点的 96.49%, 平均 Nei's 基因多样性指数 0.320 3。其中, 本研究中的多态性位点数 ( $P$ ) 和 Nei's 基因多样性指数 ( $H$ ) 均略低于蒋志敏等<sup>[13]</sup>用 ISSR 分析获得的  $P$  (98.2%) 和  $H$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	条带长度/bp		
																																	2 386	
																																		2 230
																																		1 888
																																		1 500
																																		1 445
																																		1 143
																																		1 070
																																		936
																																		800
																																		600
																																		530
																																		406
																																		400
																																		310

图 3 ISSR 标记构建 32 份怪柳分子指纹图谱

Fig. 3 Molecular fingerprint of 32 samples in *T. chinensis* set up by ISSR marker

(0.406 1); 同时本研究的  $H$  与赵景奎<sup>[14]</sup>用 RPAD 分析报道的怪柳种内  $H$  (0.313) 基本一致。进一步说明怪柳的居群内遗传多样性非常丰富, 同时也说明 ISSR 分子标记技术可以很好地用于怪柳居群内遗传多样性分析。

河北省秦皇岛市怪柳具有相对丰富的遗传多样性的原因: 一方面与其多年生的习性有关。怪柳为两性花, 既可同花授粉, 又可异花授粉, 极易发生居群内杂交, 增大基因变异的概率, 增大遗传多样

性。另一方面与其复杂的交配体系有关。怪柳繁育系统为兼性异交<sup>[19]</sup>, 由于怪柳没有无融合生殖现象, 虽然自交亲和, 但缺乏自花传粉机制, 必须通过传粉媒介 (蝇类和蜜蜂等) 为其授粉, 这就大大增加了异交的机会, 因此有可能提高怪柳遗传多样性的丰度。另外, 近几年, 秦皇岛沿海地区大量建筑的出现, 也在一定程度上增加了怪柳居群内的异交机会。

目前, 构建植物分子指纹图谱主要有特征谱带

法<sup>[20]</sup>、引物组合法<sup>[21-23]</sup>和单引物方法<sup>[24-25]</sup> 3 种方式。本研究采用单引物法, 利用 1 条重复性好的 ISSR 引物构建了 32 份怪柳的分子指纹图谱, 为今后观赏怪柳资源鉴定提供了参考。然而, 随着怪柳不断的异交, 本研究中的 ISSR 引物可能会无法鉴别, 此时应采用更多的多态性引物组合或筛选新的分子标记将其区分开, 以补充和扩展本研究初步建立的怪柳 DNA 指纹图谱。

该研究中怪柳居群内的遗传多样性非常丰富。鉴于此, 本地区应该采取就地保护政策, 建立怪柳资源保护区, 即以秦皇岛浅水湾为中心保护区, 重视大范围群体内不同类型个体的保存, 要尽量防止人为因素造成遗传资源的流失。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王 斌, 姜登钊, 李国强, 等. 怪柳抗肿瘤萜类成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 697-701.
- [3] 赵润洲, 孙仕银, 陈发奎, 等. 西河柳药理作用的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(2): 85.
- [4] Nasreen F, Navaid Z. Pharmacological and toxicological studies of Icterene, a herbal formulation of *Tamarixpa kistanica*, prepared by Hamdard Laboratories (Waqf) Paki stan, in rodents [J]. *Proc Pakistan Congr Zool*, 1993, 13(5): 185-193.
- [5] 陈柳生, 梁晓欣, 蔡自由, 等. 怪柳的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1829-1833.
- [6] 李 娟, 李玮琦, 郑 萍, 等. 多枝怪柳中的酚酸类化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2047-2050.
- [7] Stromberg J C. Functional equivalency of saltcedar (*Tamarix chinensis*) and Fremont cottonwood (*Populus fremontii*) along a free-flowing river [J]. *Wetlands*, 1998, 18(4): 675-686.
- [8] Wang Z, Liu L, Fang Y. Flowering characteristics and pollination ecology in *Tamarix chinensis* (Tamaricaceae) in the Yellow River Delta [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2005, 15(4): 353-357.
- [9] Whitcraft C R, Talley D M, Crooks J A, et al. Invasion of tamarisk (*Tamarix* spp.) in a southern California salt marsh [J]. *Biol Invasions*, 2007, 9(7): 875-879.
- [10] 杨传平. 怪柳耐盐抗旱分子基础研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [11] Gaskin J F, Schaal B A. Hybrid *Tamarix* widespread in US invasion and undetected in native Asian range [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 11256-11259.
- [12] Cui B S, Yang Q C, Zhang K J, et al. Responses of saltcedar (*Tamarix chinensis*) to water table depth and soil salinity in the Yellow River Delta, China [J]. *Plant Ecol*, 2010, 209(2): 279-290.
- [13] 蒋志敏, 陈玉霞, 包 颖. 黄河三角洲怪柳居群的遗传结构和遗传分化 [J]. 植物分类与资源学报, 2011, 33(4): 403-408.
- [14] 赵景奎, 徐立安, 解荷峰, 等. 黄河三角洲怪柳群体遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(5): 56-60.
- [15] 张 娟, 张道远, 尹克林. 刚毛怪柳基因组 DNA 提取和 RAPD 反应条件探索 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 253-256.
- [16] Yeh F C, Yang R, Boyle T. *Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Popgene, version 1.31* [M]. Canada: University of Alberta, 1999.
- [17] 刘新龙, 马 丽, 陈学宽, 等. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建 [J]. 作物学报, 2010, 36(2): 202-210.
- [18] Amos W, Harwood J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1998, 353: 177-186.
- [19] 王仲礼, 刘林德, 方炎明. 黄河三角洲怪柳的开花特性及传粉生态学研究 [J]. 亚热带植物学报, 2005, 13(4): 353-357.
- [20] 童和林, 冯素萍, 贺军虎, 等. 菠萝微卫星指纹图谱的构建 [J]. 果树学报, 2011, 28(2): 240-245.
- [21] 匡 猛, 杨伟华, 许红霞, 等. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 20-27.
- [22] 段艳凤, 刘 杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457.
- [23] 郑海燕, 粟建光, 戴志刚, 等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499-3510.
- [24] 徐宗大, 赵兰勇, 张 玲, 等. 玫瑰 SRAP 遗传多样性分析与品种指纹图谱构建 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1662-1669.
- [25] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3735-3740.