

籽用栝楼遗传多样性研究

曹 亮, 黄艳宁*, 谢 进, 彭斯文, 徐 瑞, 朱校奇

湖南省农业科学院 农业环境生态研究所, 湖南 长沙 410125

摘 要: 目的 分析不同来源籽用栝楼资源的遗传多样性。方法 应用 SRAP 分子标记技术并结合 ITS 序列分析对 11 份籽用栝楼资源 30 个样本进行遗传特征研究, 并分别应用 mega 5.0 和 NTSYS-pc 2.1 软件对 ITS 序列及 SRAP 扩增条带进行聚类分析。结果 栝楼与双边栝楼 ITS 序列存在稳定的碱基差异; 15 对 SRAP 分子标记引物扩增得到清晰条带 165 条, 其中多态条带 136 条, 多态率为 82.4%, 聚类结果显示在相似度为 0.18 时栝楼与双边栝楼资源分为 2 大类群, 双边栝楼来源的主栽品种遗传相似度较大, 在相似度为 0.90 时分为 3 个分支。结论 籽用瓜蒌来源品种多样, 主要来源于双边栝楼, 且各地栽培资源遗传差异较小。

关键词: 栝楼; 双边栝楼; SRAP; 瓜蒌子; 核糖体间隔区间

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)20-4316-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.028

Genetic diversity of *Trichosanthis Fructus* for seeds cultivating

CAO Liang, HUANG Yan-ning, XIE Jin, PENG Si-wen, XU Rui, ZHU Xiao-qi

Hunan Agro-Environment and Ecology Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China

Abstract: Objective To reveal the genetic diversity of cultivating resources of *Trichosanthes sp.* from different areas. **Methods** The genetic background of 11 populations (including 30 samples) of *Trichosanthis Fructus* were researched by both ITS and SRAP molecular markers. The software mega 5.0 and NTSY-pc 2.1 were taken to analysis the ITS sequences and SRAP polymorphic bands data respectively. **Results** There are obvious mutation in ITS sequences among *T. kirilowii* and *T. rosthornii*, ITS sequences could authenticate the different resources in some extent. 165 SRAP bands were amplified by using the optimized 15 primer pairs, and 136 were polymorphic bands, the polymorphic rate was up to 82.4%. The samples were separated into two clusters at the genetic similarity coefficient of 0.18, one cluster gathered the samples of Yuelou Num.8 (*T. kirilowii*) and the other cluster further separated into three sub-clusters at the coefficient of 0.90, which were mainly *T. rosthornii*. **Conclusion** There are several species of *Trichosanthes* have been used to harvest the seeds in China, and the major one is *T. rosthornii*. The cultivating resources of *T. rosthornii* have little difference in genetic backgrounds.

Key words: *Trichosanthes kirilowii* Maxim.; *Trichosanthes rosthorni* Harms; SRAP; *Trichosanthes Semen*; ITS

瓜蒌子为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Harms 的干燥成熟种子。具有润肺化痰、滑肠通便的功效。用于燥咳痰黏、肠燥便秘。栝楼属在我国有 30 多种植物, 分布广泛, 其中部分品种容易作为栝楼混淆品入药, 据乐崇熙等^[1]调查研究发现我国瓜蒌皮的主流商品为栝楼或双边栝楼的果皮, 主要混淆品为湖北栝楼 *Trichosanthes hupehensis* C. Y. Cheng et

Yueh 的果皮, 此外还有 10 多种同属或其他科属来源的混淆品。栝楼质量不仅受来源品种的影响, 而且受到产地、用药部位等因素的影响^[2], 因此对栝楼资源的评价需要不同方法的综合应用^[3]。其中栝楼植物的品种来源、居群结构是内在的因素, 对瓜蒌的品质影响极为明显。为了研究栝楼资源的遗传特征, 孙稚颖等^[4]、刘亚鲁等^[5]、宋艳梅等^[6]利用 RAPD 分子标记技术对山东栝楼资源遗传特征、品

收稿日期: 2017-04-25

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-21); 湖南省自然科学基金项目资助 (2016JJ6062); 作物种质创新与资源利用重点实验室 (省部共建国家重点实验室培育基地) 科学基金开放项目 (15KFXM10); 湖南省农科院科技创新项目 (2016QN01)

作者简介: 曹 亮 (1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为分子生药学、天然药物化学。E-mail: caoliang520945@126.com

*通信作者 黄艳宁 (1964—), 副研究员, 主要从事中药栽培与资源研究。Tel: (0731)84692903

种纯度及遗传多样性进行了研究,发现栝楼同一产地个体之间差异较明显,遗传特征对品质影响显著。千春录^[7]使用 AFLP 标记技术对栝楼的研究发现不同倍性栝楼材料在聚类上有差别,二倍体和八倍体栝楼遗传差异明显。高燕会等^[8]利用 ISSR 分子标记方法研究了不同产区不同用途的 34 份栝楼资源的遗传多样性,聚类结果将栝楼分为食籽用型、药食两用型和野生型 3 大类群。通过 DNA 分子标记研究,初步揭示了栝楼的遗传特征。

目前栝楼的栽培生产除了少量作为药用外,其余大部分是以籽用为主,瓜蒌子在炒制加工后作为休闲食品,称为“吊瓜子”,作为一种特色瓜子资源,瓜蒌子含有丰富的功能性蛋白质^[9]等成分,具有良好的降血糖^[10]、抗肿瘤^[11]等保健药用价值,而且瓜蒌子是传统润肺化痰、滑肠通便的药材,受到广大消费者特别是中老年人的喜爱。瓜蒌子市场需求大,由此催生了大面积的以瓜蒌子生产为目的的栝楼栽培产业,并在全国形成了一批规模的瓜蒌子专业生产合作社,特别在湖南、江西、浙江、山东等地种植面积较大。栝楼品种选育及栽培推广以籽用型栝楼为主,在栽培生产过程中,由于留种及选育的结果,各地出现了丰富的籽用栝楼资源类型,其籽粒大小、饱满程度,瓜子壳的光滑程度等方面差别显著。对于这些资源,需要进行规范的整理、保存及进一步的品种选育,但目前对于籽用栝楼资源遗传特征的研究还是空白,因此,充分研究籽用栝楼的遗传特征及资源差异,进而指导资源利用、新品种选育等具有十分重要的意义。本实验拟应用 SRAP 分子标记技术结合 ITS 序列分析研究籽用栝楼不同资源遗传差异,为籽用栝楼遗传资源、品种规范使用提供研究基础。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

栝楼材料自 2011 年开始收集并种植在湖南省农业科学院药用植物资源圃,经湖南省农业科学院朱校奇研究员鉴定为栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.、双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* Harms 及裂苞栝楼 *Trichosanthes fissibracteata* C. Y. Wu, 并分别编号,种子凭证标本保存于湖南省农业生物资源利用研究所标本库,活体植物保存在资源圃。2016 年 7 月采集栝楼植物幼嫩叶片作为实验材料,样品采集后带回实验室并立即进行 DNA 提取,样品采集情况见表 1,各资源种子形态见图 1。

表 1 样品列表

Table 1 List of plant materials

样品编号	品种编号	植物名	商品名	产地
1~3	1	双边栝楼	大籽瓜蒌	江西
4~6	2	双边栝楼	普通瓜蒌	江西
7~9	3	双边栝楼	野生瓜蒌	湖南长沙
10~12	4	双边栝楼	白籽瓜蒌	湖南长沙
13	5	双边栝楼	地方种	湖南怀化
14~16	6	双边栝楼	黑籽瓜蒌	湖南长沙
17~19	7	栝楼	越蒌 8 号	安徽
20~22	8	双边栝楼	越蒌 9 号	安徽
23~25	9	双边栝楼	白籽二代	湖南长沙
26~28	10	双边栝楼	黑籽二代	湖南长沙
29~30	11	裂苞栝楼	广西瓜蒌	广西



1~11-品种编号同表 1

1~11-variety number were same as table 1

图 1 籽用栝楼种子形态

Fig. 1 Resources of *Trichosanthes Fructus* for seeds cultivation

1.2 仪器

T-Gradient Thermoblock PCR 仪 (Biometra 公司); U410 Ultra low temperature freezer 超低温冰箱 (Premium 公司); D-78532 Tuttlingen Mikro 22R 高速冷冻离心机 (Hettich zentrifugen 公司); ND-1000 NanoDrop 核酸定量仪; HVE-50 高温灭菌锅 (Hirayama 公司); PL 5124 Purelab Plus UV/UF 超纯水系统 (Pall 公司); DYCZ-28D 电泳仪 (北京市六一仪器厂)。

1.3 试剂

ITS、SRAP、SCAR 引物由上海生工有限公司合成;测序在华大基因完成。

Taq DNA Polymerase、100 bp ladder、dNTP、植物 DNA 快速提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖为 Biowest Agarose 公司产品,聚丙烯酰胺凝胶电泳相关试剂均为 Amresco 公司分装,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 栝楼基因组 DNA 的提取

利用天根生化科技有限公司的植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取栝楼 DNA,用液氮将植

物叶片研磨成粉, 转移约 50 mg 粉末至 2 mL EP 管中, 并用移液器加入 60 °C 预热 GP1 提取缓冲液 700 μ L, 60 °C 水浴 30 min, 取出冷却, 用三氯甲烷-异戊醇 (24:1) 抽提, 并于 20 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 用 GP2 溶液混合, 然后按试剂盒操作, 最后用 100 μ L ddH₂O 洗脱, 取 3 μ L 电泳检测, -20 °C 保存样品。

2.2 ITS 序列扩增及分析

2.2.1 ITS 序列扩增 使用 ITS 通用引物: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS 4: 5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3' 对栝楼样品进行扩增, 获得 PCR 产物。扩增体系: 总体积为 50 μ L, 其中 ddH₂O 37.0 μ L, 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺) 5.0 μ L, Taq 酶 (2.5 U/ μ L) 1.0 μ L, dNTP 混合液 (10 mmol/L) 1.0 μ L, ITS1 引物 2.0 μ L (10 nm/mL), ITS4 引物 2.0 μ L (10 nm/mL), DNA 模板 2 μ L。扩增程序为 94 °C 预变性 4 min 后, 以 94 °C, 1 min、55 °C, 30 s、72 °C, 40 s 循环 32 次, 72 °C 延伸 5 min, 之后 16 °C 保存。

2.2.2 扩增产物检测与测序 反应结束后取 5 μ L 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min (电压 5 V/cm)。检测扩增效果。对扩增效果良好的样品, 将 PCR 产物进行 ITS1、ITS4 双向引物测序分析, 获得 ITS 测序谱图和序列文件。

2.2.3 序列分析 测序后得到各样品的 ITS 序列, 使用 bioedit 软件打开谱图, 观察序列杂合情况, 剔除长度不够及谱图杂乱的序列, 然后进行比对分析, 比对整齐后删掉两端引物区, 获得的比对结果在 mega 4.0.2 软件中打开, 在软件 “Phylogeny” 选项下分别使用邻接法 (neighbor joining, NJ) 和加权配对法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 构建系统发生树 (Phylogeny tree)。使用软件 DNAsp Ver. 5.10.01 分析序列的单倍型。

2.3 SRAP 分析方法

2.3.1 SRAP 引物的筛选 将合成的 10 条正向引物 (Me1~Me10) 与 10 条反向引物 (Em1~Em10) 组合, 获得 100 个引物对, 然后使用栝楼样品对 100 个引物对进行筛选, 选择电泳条带明亮、带型丰富的引物对用于 SRAP 分析。引物见表 2。

2.3.2 SRAP 分析方法及体系 SRAP 的 PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR buffer (含 20 mmol/L Mg²⁺) 3.0 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, DNA 模板 (30 ng/ μ L)

表 2 栝楼 SRAP 分子标记引物

Table 2 SRAP primers for analysis of *Trichosanthis Fructus*

编号	序列 (5'-3')	编号	序列 (3'-5')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	Em8	GACTGCGTACGAATTCAC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em10	GACTGCGTACGAATTCAT

1.0 μ L, Em 上游引物 (10 nm/mL) 0.5 μ L, Me 下游引物 (10 nm/mL) 0.5 μ L, Taq 酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 24.0 μ L, 总体积 30 μ L。反应程序: 94 °C 3 min, 94 °C、30 s, 35 °C、45 min, 72 °C、45 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 8 min, 16 °C 保温。用选择的扩增效果较好的引物扩增所有样品, 获得 PCR 产物。

2.3.3 电泳及显影观察 琼脂糖凝胶电泳: 对 PCR 产物先用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 观察 PCR 扩增效果。

聚丙烯酰胺凝胶电泳: 配制 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 室温凝结 1.5 h, 然后进行电泳, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE, 先预电泳 20 min, 电压 300 V。上样量为 2 μ L, 并用 GsDL2501 marker 做参照。电压采用 270 V, 2.5 h 电泳后用银染方法进行染色。显影完成后, 将胶块取出, 在白光灯上观察拍照, 然后用保鲜膜包裹保存。

2.3.4 遗传背景的分析 记录聚丙烯酰胺凝胶图谱上长度为 200~800 bp DNA 条带的有或无, 条带清晰可辨的记为 “1”, 缺失或模糊不清的记为 “0”, 将观察的结果以 Excel 形式输入计算机, 用 NTSYS-pc 2.1 软件中 ntedit 组件将 Excel 数据转换为 “NTS” 数据表, 然后用 ntsys 软件进行计算, 方法为在 “General” 选项下使用 “Stand” 组件计算, 获得标准化数据后在 “Similarity” 选项下使用 “SimQual” 组件计算, 获得的数据表在 “Clustering” 选项下按加权配对法 (UPGMA) 进行 “SAHN” 聚类分析, 获得聚类树。并对聚类结果经过 “Coph” 组件计算得到 Coph 值, 在 “Graphics” 选项下通过

“MxComp” 组件计算聚类树 Coph 值和 “SimQual” 数据表的矩阵相关系数 (Matrix correlation), 表征聚类树和数据表的相关性。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取效果及 ITS 序列分析

3.1.1 ITS 扩增及测序 DNA 提取后电泳显示清晰的 DNA 条带, 说明 DNA 提取效果良好, 测定各样品的 DNA 浓度。对各样品进行 ITS 序列扩增并电泳检测, 对部分扩增产物较少的样品重新扩增并电泳检测, 见图 2。最后将成功的 PCR 产物进行测序。

3.1.2 ITS 结果分析 获得所有样品的测序文件及序列。通过软件分析发现 21 号样品序列较短, 25 号样品较杂, 进行剔除, 最后获得 28 个样品长度为 621 bp 的比对整齐的序列文件。分析发现在栝楼和其他品种之间, 存在 150、151、158、174 位稳定突变, 碱基由 “CCAA” 突变为 “TTGG”, 这些碱基

突变, 可以实现将栝楼与双边栝楼、裂苞栝楼区分, 裂苞栝楼 ITS 也与双边栝楼有一定差异, 但没有稳定的差异碱基; 而双边栝楼资源 ITS 序列变异较大, 种群内个体无稳定突变。通过 mega 5.0 软件聚类分析后结果见图 3。由图 3 可知, 17~19 号栝楼, 个体之间序列差异极小, 但与其他栝楼资源存在一定差异; 其 ITS 序列在 Genebank 中的 Blast 分析结果显示其与栝楼序列相似度最大。29、30 号为裂苞栝楼, 其 ITS 序列在 NJ 算法中聚在一起, 但在 UPGMA 算法中存在较大差异。其余双边栝楼资源的 ITS 序列个体差异明显, 同一种群来源的个体, 其序列没有明显的聚集趋势, 没有明显突变产生。利用上述栝楼、双边栝楼 26 条序列, 并从 Genebank 下载栝楼的 4 条 ITS 序列 (登陆号分别为 FJ980304.1、GQ845140.1、GQ845146.1、GU059520.1) 共 30 条序列进行单倍型分析, 结果发现一共有 26 个单倍型, 其中 17~19 为 1 个单倍型, 15 和 23 为 1 个单

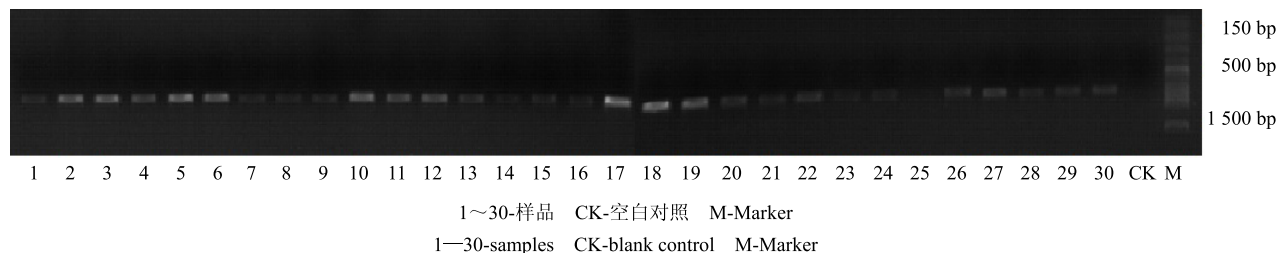


图 2 ITS 序列 PCR 扩增效果
Fig. 2 PCR products of ITS sequences

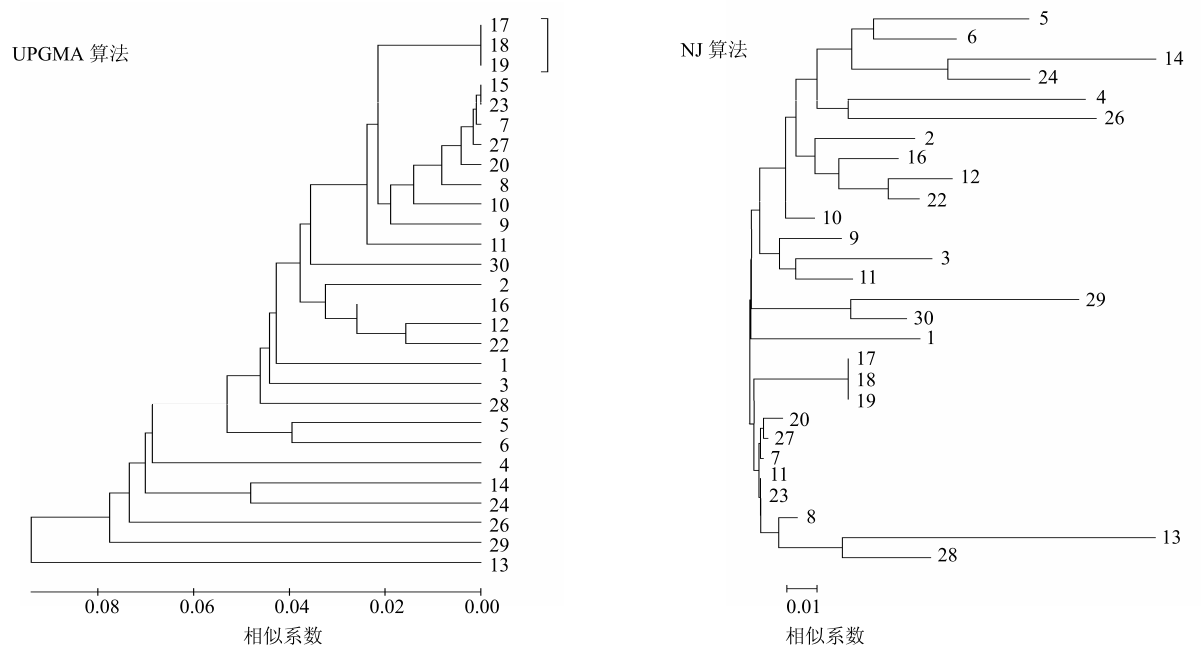


图 3 ITS 序列系统发生树
Fig. 3 Phylogeny tree of ITS sequences

倍型; Genbank 的 4 个序列分为 3 个单倍型。

3.2 SRAP 分子标记

3.2.1 SRAP 引物筛选及扩增 对 100 对引物进行筛选, 从中选择扩增效果良好、条带清晰、带型丰富的引物对进行 SRAP 分析, 本研究共选择了 18 个引物对用于所有瓜蒌样品 DNA 的扩增, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 得到的图谱经过筛选, 获得 15 个引物对的清晰图谱, 进行条带统计和多态性分析, 结果见表 3。其中 M4+E6 组合引物的扩增结果见图 4。

通过对图谱条带的识别, 构建了各引物对的“1, 0”数据表格。各引物对扩增条带从 6 到 17 条不等, M2+E3 扩增条带最少, 为 6 条, 而 M10+E4 扩增条带最多, 为 17 条。15 个引物对共获得清晰条带 165 条, 其中共有条带 29 条, 多态性的条带有 136 条, 多态率为 82.4%。从各谱图能观察到样品 17~19 有稳定的多态性条带, 与其他样品有明显差异。

表 3 栝楼多态分析的引物对

Table 3 Primer pairs for polymorphism analysis of *Trichosanthis Fructus*

编号	组合	总带数	多态带数
1	M2+E1	12	10
2	M2+E3	6	6
3	M2+E5	14	10
4	M2+E8	9	6
5	M4+E2	12	11
6	M4+E6	12	10
7	M5+E2	9	8
8	M5+E3	12	11
9	M5+E8	15	11
10	M6+E8	10	7
11	M9+E2	9	8
12	M9+E3	7	7
13	M9+E8	8	7
14	M10+E3	13	10
15	M10+E4	17	14
总计		165	136

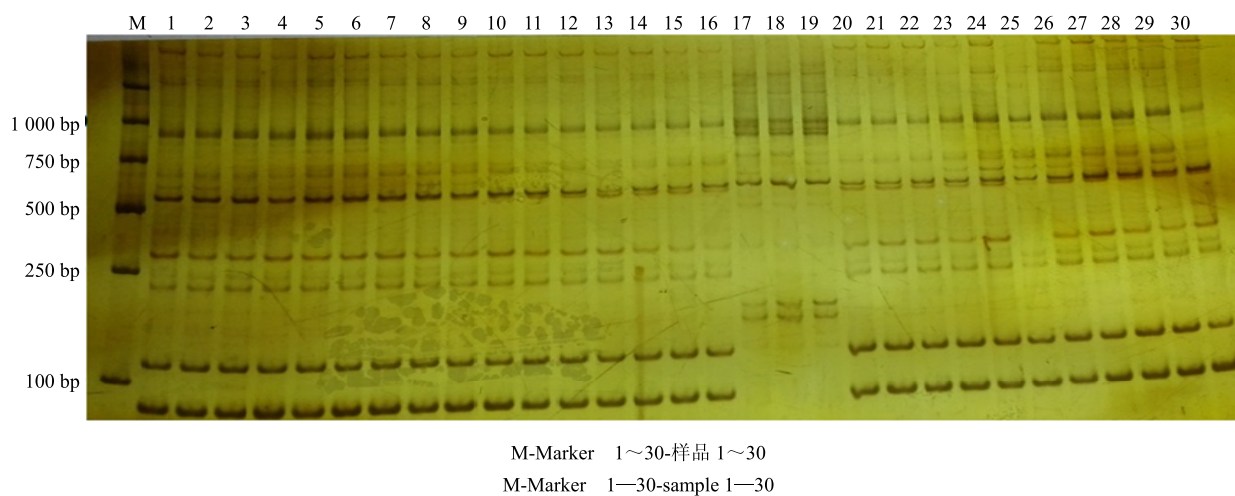


图 4 M4+E6 引物组合扩增结果

Fig. 4 Amplification results of *Trichosanthis Fructus* by primer pair of M4 + E6

3.2.2 SRAP 多态性分析 对各引物扩增结果的“1, 0”数据表经 NTSYS-pc 2.1 软件分析后得到的聚类结果见图 5。MxComp 检测显示矩阵相关系数 $r=0.9975$, 聚类树构建良好。从聚类结果可知, 所有样品在 0.18 的系数时被分为 2 类, 一类包含 17~19 号样品, 这 3 个样品是越蒌 8 号, 为栝楼品种, 可见该品种资源与其他品种差异极其明显。第 2 类在相似系数为 0.90 时可以分为 3 支, 从下往上, 第 1 支包含 4~7、28~30 共 7 个样品, 其中 4~6 号为江西普通瓜蒌, 而 29、30 为裂苞瓜蒌, 可见江西普通瓜蒌与裂苞瓜蒌遗传背景较相似, 裂苞栝楼的遗传特征较栝楼而言, 与双边栝楼较相近。第二支

为 23~25 号样品, 为白籽瓜蒌二代, 该资源遗传上有较好的稳定性。第 3 支分为 2 个小支, 第 1 小支包含了 1~3、8~16、26、27 共 14 个样品, 分别为江西大籽瓜蒌 (1~3)、长沙野生瓜蒌 (8、9)、金井白籽 (10~12)、黑籽 (14~16)、黑籽二代 (26、27) 和怀化地方种 (13), 这些样品主要是湖南、江西地区广泛栽培的种质资源, 都来源于双边栝楼, 其籽粒较大, 长椭圆形, 类似葵花籽, 易于剥开食用, 这些资源的遗传差异较小; 第二小支为 20~22, 为越蒌 9 号, 从安徽引进, 样品间遗传背景很近, 而与该支中其他资源则较远, 可见该栽培资源与其他双边栝楼有一定差异。

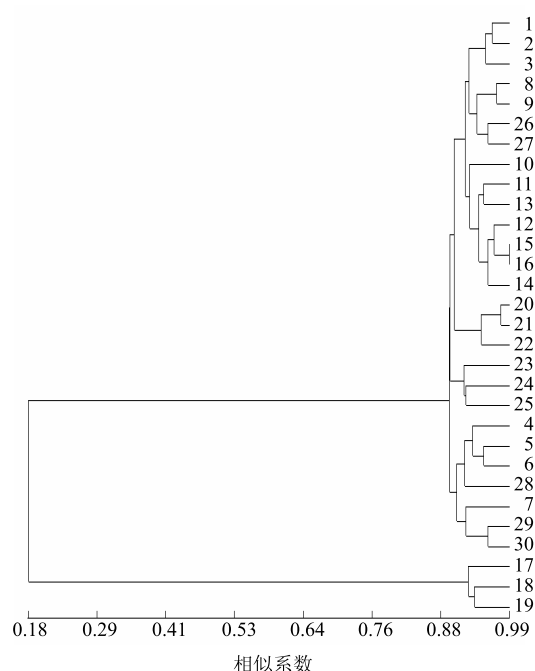


图 5 栝楼 SRAP 分子标记聚类结果

Fig. 5 Dendrogram of *Trichosanthis Fructus* by SRAP molecular methods

总体而言,除了越葵 8 号栝楼与其他资源遗传背景差异较大之外,其余种质资源遗传差异较小。裂苞栝楼尽管品种来源不同,种子形态比较特别,而其遗传特征与江西普通瓜蒌较近。湖南、江西等地栽培的栝楼资源,主要来源于双边栝楼,各资源种子形态较相似,样品间遗传差异较小,但也有按来源不同各自聚集成一小支的趋势,可见尽管遗传背景较相似但还是有一定的差异。

4 讨论

4.1 ITS 及 SRAP 在栝楼的遗传特征研究中的应用

本研究使用 ITS 序列来研究籽用栝楼资源的遗传特征,结果发现籽用栝楼与双边栝楼在 ITS 序列中存在一些稳定的碱基突变位点,这可以作为 SNP 分型及鉴别的有效位点,实现资源的快速鉴别^[12-14],这在栝楼种苗、生药的鉴定等领域具有良好的研究和应用价值^[15],此外 ITS 序列的差异对于资源系统分类学研究^[16-17]及进化发育研究^[18]也有良好的参考价值。ITS 序列系统发生树表明栝楼和双边栝楼存在一定差异,但在聚类群上不能将栝楼和双边栝楼区分开;但在 SRAP 分子标记的聚类结果中,栝楼资源和双边栝楼、裂苞栝楼存在明显的差异,栝楼聚集为单独的一群。可见基于基因组差异的 SRAP 分子标记技术相较于 ITS 单一序列在栝楼的

遗传背景的研究上效果更好。

4.2 SRAP 分子标记技术在栝楼资源研究中的应用前景

栝楼雌雄异株,属于异花授粉植物,自然杂交普遍存在,而且栝楼多倍性品种较多,由于引种等因素,籽用栝楼资源在不同产地之间迁移迅速,其种质评价存在一定的困难,分子标记是行之有效的种质评价手段。SRAP 分子标记技术通过巧妙设计引物,对开放阅读框(open reading frames, ORFs)进行扩增,能够得到重复性好,多态性丰富的条带,被广泛应用到药用植物的遗传背景研究中^[19-21],SRAP 技术应用于栝楼资源遗传背景研究的报道尚属首次,该分子标记技术不仅可用于遗传多样性研究,同时对于栝楼的性别鉴别也有良好的应用价值,栝楼生产中主要使用雌株,但幼苗期的性别鉴别一直是一个难题^[22],目前国内外有使用 ISSR^[23-24]及 RAPD^[25-26]技术开展栝楼性别分子标记研究,并开发性别鉴定的 SCAR 标记报道,但只在印度同属常用蔬菜植物“指瓜”*T. dioica* 中取得成功并能验证,栝楼的性别鉴别还没有很好的分子标记方法^[27],SRAP 以其高效共显、条带易于克隆测序的特征,对于性别鉴定、品种鉴别研究具有良好的应用价值。

4.3 籽用栝楼资源的保护利用

瓜蒌子是传统的中药材,在历史上主要作为药物使用,随着资源的不断发掘利用,逐渐产生了可以食用种子的栝楼资源,通过长期的驯化与选育形成了目前栽培较广泛的一些籽用品种,且产生了一定的遗传变异^[8]。本研究发现目前使用的籽用栝楼资源主要来源于双边栝楼,其籽粒较大、皮薄,易于剥食。各资源遗传背景相似度高,遗传相似系数在 0.9 的水平,同时也发现少量来源于栝楼品种的资源,与双边栝楼遗传差异较大。研究还发现籽用栝楼栽培种的 F₂ 代资源,如白籽二代,其遗传背景与母本资源存在较明显差异;同一栽培资源样品在聚类时聚集到多个类群中,遗传特征不稳定,可见部分资源并没有形成稳定的遗传特征,可能会产生种性退化,要对这些资源进行妥善保存与利用,保持优良品种的种性,注意引种的科学性,减少杂交等原因对种性的改变,同时也需要对部分资源进行进一步的选育工作,提高资源的稳定性和优异性。

参考文献

[1] 乐崇熙,黄璐琦,殷晓杰,等. 18 种瓜蒌皮的形态学研究

- 究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(7): 396-397.
- [2] 温春秀, 刘金娜, 张迪, 等. 不同居群栝楼各药用部位质量综合评价研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2460-2466.
- [3] 王真真, 郭新苗, 辛杰, 等. 生物技术在栝楼种质资源研究中的应用概况 [J]. 中成药, 2013, 35(2): 364-367.
- [4] 孙稚颖, 周凤琴. 山东产瓜蒌不同农家品种的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 426-429.
- [5] 刘亚鲁, 李峰, 宋艳梅, 等. 山东道地药材瓜蒌 7 个样品的 RAPD 分析 [J]. 山东中医杂志, 2012, 31(3): 196-197.
- [6] 宋艳梅, 李健, 李峰. 山东同一种植基地不同形态栝楼的遗传多样性和亲缘关系研究 [J]. 中药材, 2015, 38(8): 1639-1642.
- [7] 千春录. 药用植物栝楼种质资源及多样性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [8] 高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 363-366.
- [9] Ye X J, Ng C C W, Ng T B, *et al.* Ribosome-inactivating proteins from root tubers and seeds of *Trichosanthes kirilowii* and other *Trichosanthes* species [J]. *Prot Pept Lett*, 2016, 23(8): 699-706.
- [10] Lo H Y, Li T C, Yang T Y, *et al.* Hypoglycemic effects of *Trichosanthes kirilowii* and its protein constituent in diabetic mice: The involvement of insulin receptor pathway [J]. *BMC Complem Altern M*, 2017, 17(1): 53-60.
- [11] Song L, Chang J, Li Z Y. A serine protease extracted from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis via the PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathway in human colorectal adenocarcinoma cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7(2): 843-854.
- [12] 曹亮, 蒋超, 彭华胜, 等. 白术、苍术种子位点特异性 PCR 鉴别方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2567-2570.
- [13] 曹亮, 秦双双, 袁媛, 等. 薄荷、留兰香特异性引物 PCR 鉴别方法研究 [J]. 中药材, 2014, 37(1): 44-48.
- [14] Chao J, Liang C, Yuan Y, *et al.* Barcoding melting curve analysis for rapid, sensitive, and discriminating authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) from its adulterants [J]. *Bio Med Res Inter*, 2014, 14(1): 1-10.
- [15] 田红林, 轩辕欢, 孙芸. 分子标记在天花粉鉴定中的应用价值研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2429-2430.
- [16] 周涛, 黄璐琦, 江维克. 栝楼属 (葫芦科) 植物的系统演化与地理分布 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(3): 414-423.
- [17] 周涛, 黄璐琦, 崔光红, 等. 栝楼属基于核糖体 ITS 序列的系统发育分析 [J]. 植物研究, 2010, 30(5): 568-575.
- [18] Hugo J B, Hanno S, Mats T, *et al.* Evolution and loss of long-fringed petals: A case study using a dated phylogeny of the snake gourds, *Trichosanthes* (Cucurbitaceae) [J]. *BMC Evol Biol*, 2012, 12(108): 1-16.
- [19] 柴锟, 刘红昌, 李金玲, 等. 基于 SRAP 分子标记的天麻遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2974-2981.
- [20] 王硕, 何金宝, 农民英, 等. 薏苡种质资源的 SRAP 分子标记研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 112-117.
- [21] 宗成堃, 宋振巧, 陈海梅, 等. 利用 SSR、SRAP 和 ISSR 分子标记构建首张丹参遗传连锁图谱 [J]. 药学学报, 2015, 50(3): 360-366.
- [22] Bhowmick B K, Jha S. Dynamics of sex expression and chromosome diversity in Cucurbitaceae: A story in the making [J]. *J Genet*, 2015, 94(4): 793-808.
- [23] Sinchan A, Soumen S, Tapas K B, *et al.* Identification and validation of a new male sex-specific ISSR marker in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. *Sci World J*, 2014, 14(1): 1-6.
- [24] Nanda S, Kar B, Nayak S, *et al.* Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. *Sci Horti-Amsterdam*, 2013, 13(150): 11-15.
- [25] Kumar S, Singh B D, Sinha D P. RAPD markers for identification of sex in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.) [J]. *Indian J Biotechnol*, 2012, 11(3): 251-256.
- [26] 曲益涛. 栝楼性别转化的 RAPD-SCAR 标记研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [27] 宁志怨, 董玲, 李卫文, 等. 栝楼性别的分化与鉴定研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 4-6.