

三叶青种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

尹明华¹, 谢妮妮¹, 徐文慧¹, 占学林¹, 廖玉¹, 万志庭¹, 蔡红², 陈荣华²

1. 上饶师范学院生命科学院, 江西 上饶 334001

2. 上饶市红日农业开发有限公司, 江西 上饶 334700

摘要: 目的 对我国三叶青种质资源 64 个样本的遗传多样性进行分析。方法 利用 ISSR-PCR 技术进行扩增, 然后利用 POPGENE 32 软件及 NTSYS 软件分析三叶青种质资源 64 个样本的遗传多样性及亲缘关系, 并根据 UPGMA 法, 构建亲缘关系树状图。结果 从 30 条引物中筛选出 10 条条带清晰、重复性好的引物对 64 份供试材料的基因组 DNA 进行扩增。扩增出了 83 个多态位点, 多态百分数为 71.43%~100.00%, 平均多态百分数为 94.31%, 引物 S17 扩增得到的多态位点最多, 为 11 个; 引物 P6 扩增得到的多态位点最少, 为 5 个, 10 条引物扩增得到的多态位点平均为 8.3 个; 遗传多样性分析显示, 平均检测等位基因数 (N_a) 为 1.943 1, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.381 08, 64 个样本的平均 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.242 98, 平均 Shannon 多样性指数 (I) 为 0.385 83。64 个样本遗传相似系数的变异范围为 0.431 8~0.988 6。根据相似系数矩阵按 UPGMA 法进行聚类, 在遗传相似性系数为 0.715 5 处, 64 份供试材料可分为 6 组; 另外, 根据 10 个 ISSR 引物的扩增结果, 筛选出引物 ISSR 20、UBC857 和 S17 扩增的 DNA 指纹图谱可用于 64 个三叶青样本种质的鉴定。结论 我国三叶青种质资源拥有丰富的遗传多样性和基因的相对稳定性, ISSR 分析可揭示我国三叶青种质资源间的亲缘关系, 为评价、鉴定和新品种选育提供一定的参考依据。

关键词: 三叶青; 种质资源; 遗传多样性; ISSR 分析; UPGMA 法

中图分类号: S567.23

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)20-4884-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.027

Genetic diversity analysis of *Tetragastria hemsleyanum* germplasm resources by ISSR

YIN Ming-hua¹, XIE Ni-ni¹, XU Wen-hui¹, ZHAN Xue-lin¹, LIAO Yu¹, WAN Zhi-ting¹, CAI Hong², CHEN Rong-hua²

1. College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

2. Shangrao Red Sun Agricultural Development Co., Ltd., Shangrao 334700, China

Abstract: Objective In this paper, the genetic diversity of 64 samples of *Tetragastria hemsleyanum* germplasm resources in Chinese was analyzed. **Methods** ISSR-PCR was firstly used to amplify, and then POPGENE 32 software and NTSYS software was used to analyze the genetic diversity and phylogenetic relationship of 64 samples of *T. hemsleyanum* germplasm resources, and phylogenetic tree was constructed according to the UPGMA method. **Results** Ten primers with clear and reproducible bands were screened from 30 primers and used for genomic DNA amplification of 64 sample materials. A total of 83 polymorphic loci were amplified, whose polymorphic percentages were 71.43%—100% and average polymorphism percentage was 94.31%. The amplification polymorphic loci of primer S17 were the most (11) and the amplification polymorphic loci of primer P6 were the least (5), the average amplified polymorphic loci of 10 primers were 8.3. Genetic diversity analysis showed that the average number of alleles (N_a) of 64 samples was 1.943 1, the average effective allele number (N_e) was 1.381 08, the average Nei's gene diversity index (H) was 0.242 98, and the average Shannon diversity index (I) was 0.385 83. The variation range of the genetic similarity coefficient of the 64 samples was 0.431 8—0.988 6. A total of 64 samples were divided to six groups by UPGMA clustering method according to the similarity coefficient matrix when the genetic similarity coefficient was 0.715 5, which showed the abundant genetic diversity and relative gene stability of *T. hemsleyanum* germplasm resources. In addition, amplification figures by primers ISSR20, UBC857, and S17 were screened based on amplification result of 10 ISSR primers, and DNA fingerprinting was constructed, which can be used to identify 64 samples of *T. hemsleyanum* tested. **Conclusion** There are abundant genetic diversity and relative gene stability in *T. hemsleyanum* germplasm resources in China. ISSR analysis can reveal the

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860084)

作者简介: 尹明华 (1973—), 女, 江西永新人, 硕士, 副教授, 从事植物生物技术研究。

genetic relationship among *T. hemsleyanum* germplasm resources in China, and provide certain reference for the evaluation, identification and new variety breeding of *T. hemsleyanum* germplasm resources in China.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; germplasm resources; genetic diversity; ISSR analysis; UPGMA

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg, 学名三叶崖爬藤, 为葡萄科崖爬藤属植物, 又名蛇附子、石抱子、金线吊葫芦, 是我国特有濒危珍稀药用植物, 主要分布于我国浙江、湖南、江西、福建、广西、重庆、湖北、四川、广东、贵州等地, 生于山坡灌丛、山谷、溪边林下岩石缝中^[1]。三叶青临床主要用于治疗小儿高热惊厥、腹痛、肺炎、哮喘、肝炎、肿瘤等症, 且疗效显著^[2-3]。目前对三叶青的研究主要集中于栽培^[4-5]、组培^[6]、药理^[7]和化学成分^[8-9]等方面。但关于三叶青种质资源遗传多样性的 DNA 分子标记分析少见报道。ISSR (inter-simple sequence repeat), 即简单重复序列间扩增, 是在微卫星基础上建立的分析方法, 具有快速高效、操作简单、引物特异性强、稳定性好、成

本低廉、多态性丰富、重复性好等优点^[10-11]。朱波等^[12]和 Peng 等^[13]分别对三叶青全国主分布区 24 份种质和 27 份种质进行了遗传多样性 ISSR 分析和序列相关扩增多态性 (SRAP) 分析, 但多态性比例较低, 原因可能是该实验所取材料均为一个种, 属于种内变异, 相比种间或居群间变异小, 其次可能取材大多为浙江种质, 种源地组成较为单一。本课题组以全国 64 个三叶青品种为研究对象, 利用 ISSR 标记进行遗传多样性和亲缘关系分析, 并在此基础上构建 DNA 指纹图谱, 旨在为三叶青的种质保存和品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

64 个样本 (表 1) 取自于上饶市红日农业开发

表 1 三叶青 64 个样本信息

Table 1 Information on 64 samples of *T. hemsleyanum*

编号	种源地	海拔/m	编号	种源地	海拔/m
1	江西怀玉山太阳坑	315	33	江西德兴暖水	328
2	湖北永州黄田铺	364	34	浙江景宁大漈	894
3	重庆药用植物园	1 048	35	福建蒲城县笏杯岩	394
4	湖南吉首德夯	318	36	浙江遂昌白马山	396
5	湖南张家界森林公园	1 110	37	浙江淳安大市花石源	310
6	重庆潼南县上和镇	1 128	38	浙江宁波天童寺南山	362
7	湖南怀化绥宁县党坪	612	39	江西弋阳三县岭	569
8	湖南沅陵清水坪	356	40	江西怀玉山金刚峰	457
9	重庆彭水	589	41	江西玉山横街清溪	465
10	重庆金佛山山泉镇	1 172	42	安徽黄山玉屏景区	835
11	湖南凤凰南华植物园	658	43	江西玉山必姆坳村	368
12	四川峨眉山清音阁	1 426	44	浙江宁波天童寺钟乐海	558
13	湖北星斗山	687	45	浙江丽水莲都东西岩	446
14	浙江温州永嘉四海山	386	46	浙江富阳新登外官	332
15	湖南张家界金鞭溪	603	47	福建武夷山天心永乐寺	563
16	广西乐业龙角山	996	48	浙江台州三门县花桥	563
17	广西百色富宁	1 586	49	福建三明三元吉口	550
18	广西乐业龙角山	996	50	宁波市天童寺小天童	467
19	广西桂林植物研究所	370	51	江西丰城市玉华山	752
20	贵州黄果树景区	518	52	江西婺源段莘乡五龙山	518
21	广西龙胜银水侗寨	970	53	安徽黄山凤凰源景区	648
22	广西崇仁明仁	784	54	江西贵溪樟坪畲族乡	756
23	广西龙胜花坪红毛冲	870	55	浙江舟山白泉镇	328
24	云南麻栗坡中寨村	1 700	56	福建光泽	581
25	广西桂林龙胜粗江	930	57	江西安远老鼠嘴	580
26	云南文山县古木镇	1 863	58	江西鹰潭龙虎山	386
27	贵州湄潭茅坪	1 060	59	浙江开化洪源	481
28	广东始兴都亨乡	319	60	江西南丰泰和镇果村	346
29	广东韶光仁化县	462	61	江西南昌梅岭梅谷	469
30	台湾阿里山	1 175	62	浙江金华武义柳城	324
31	海南尖峰岭森林公园	520	63	江西宜黄徐坊镇邓家	565
32	江西井冈山	672	64	福建建阳华家山林场	725

有限公司位于怀玉山的三叶青种质资源库和三叶青品种园,由上饶市红日农业开发有限公司陈荣华工程师鉴定为三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg。所有供试植株均为野生种,每个样本随机选取 3 株,每株采集 2 枚健康的幼叶,置于 -80°C 超低温冰箱中保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采取改良的 CTAB 法^[11]进行 DNA 提取。

1.2.2 ISSR 分析 PCR 扩增体系 (25 μL): DNA 模板约 50 ng, $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , 引物 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 4 种 dNTPs 各 0.25 $\mu\text{mol/L}$, MgCl 21.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.25 U。PCR 扩增程序为 94°C 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环: 94°C 变性 45 s, $55\sim 62^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72°C 延伸 1.5 min, 循环结束后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 结束后,将 PCR 产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳中检测。引物信息见表 2。

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

引物代码	引物名称	引物序列 (5'→3')	引物代码	引物名称	引物序列 (5'→3')
H1	ISSR20	GGAGAGGAGAGGAGA	H16	UBC857	ACACACACACACACACYG
H2	P4	GGATGCAACACACACACAC	H17	UBC856	ACACACACACACACACYA
H3	P6	ACACACACACACACACC	H18	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
H4	P21	CTCTCTCTCTCTCTCTT	H19	0531-018	AGAGAGAGAGAGAGAGCTTG
H5	P10	GACAGACAGACAGACA	H20	UBC872	GATAGATAGATAGATA
H6	S9	GTGTGTGTGTGTGTGTGTYC	H21	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
H7	P14	GTGTGTGTGTGTGTGTT	H22	0531-009	ACACACACACACACACGA
H8	P7	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	H23	UBC852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA
H9	P13	CTCTCTCTCTCTCTCTCTC	H24	UBC888	BDBCACACACACACACA
H10	P17	GTGTGTGTGTGTGTGTGG	H25	S15	CACACACACACAGT
H11	P12	GACACACACACACACAC	H26	S19	CTGGTGTGTGTGTGTGTGT
H12	P49	CTCTCTCTCTCTCTCTA	H27	S20	CACACACACACAGG
H13	ISSR36	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	H28	S16	CTCTCTCTCTCTCTCTCTG
H14	ISSR28	CACACACACACACACAG	H29	S17	GAGAGAGAGAGAGG
H15	P42	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	H30	S18	GAGAGAGAGAGAGAGAGAA

1.2.3 数据统计分析 PCR 扩增产物的电泳位置在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带记为 1, 无 DNA 条带记为 0。形成 ISSR 的表型数据矩阵 NTSYS 软件计算遗传相似系数 (GS), 并且按照 GS 进行 UPGMA 聚类分析。用 POPGENE 32 软件对供试材料的遗传多样性指数进行分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

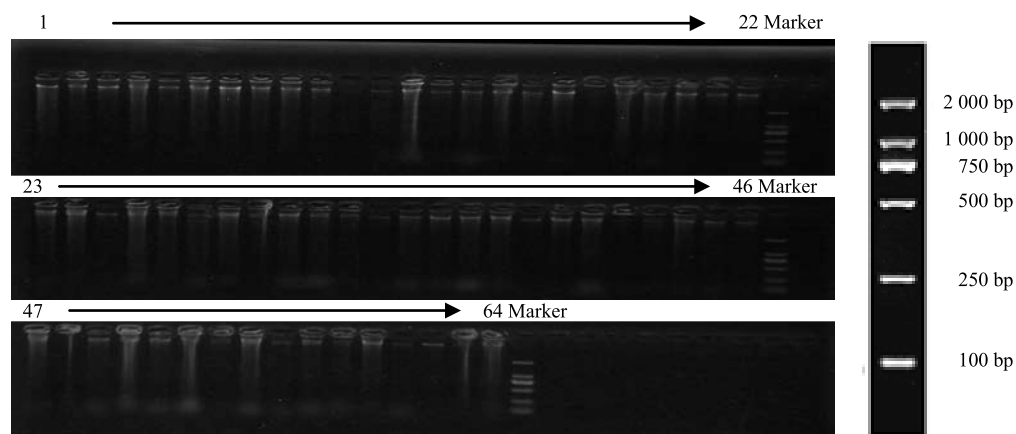
供试材料的基因组 DNA 经紫外检测显示, 64 个三叶青品种基因组 DNA 的质量浓度为 $200\sim 800\text{ ng}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 $1.8\sim 2.0$ 。电泳检测显示, 64 个三叶青品种基因组 DNA 条带整齐, 主带清晰明亮, 无拖尾, 无电泳可见的 RNA, 表明其无降解而且纯度很高, 可以用于后续 ISSR-PCR 扩增, 见图 1。

2.2 引物筛选

用 30 个 ISSR 引物进行 PCR 扩增后, 发现 ISSR20、0531-009、P4、P6、P7、P12、UBC857、S9、S17、S20 10 个 ISSR 引物的扩增条带清晰, 条带数较多 (图 2), 多态性良好, 且易于扩增。这 10 个 ISSR 引物用于后续实验。

2.3 ISSR 批量实验检测结果

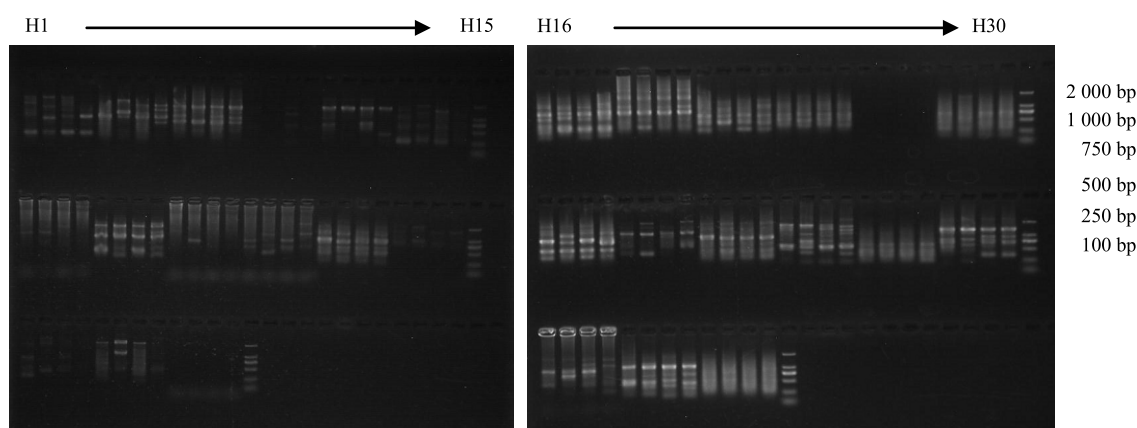
ISSR20、0531-009、P4、P6、P7、P12、UBC857、S9、S17、S20 10 条引物的 ISSR 扩增图谱见图 3。10 条引物在 64 个三叶青种质中共扩增出了 83 个多态位点, 多态百分数为 $71.43\%\sim 100\%$, 平均多态百分数为 94.31% (表 3)。从单个引物扩增得到的多态位点来看, 引物 S17 扩增得到的多态位点最多, 为 11 个; 引物 P6 扩增得到的多态位点最少, 为 5 个, 10 条引物扩增得到的多态位点平均为 8.3 个;



从左到右依次为样本 1~64 和 Marker
From left to right are samples numbered 1—64 and Marker

图 1 DNA 提取检测结果

Fig. 1 DNA extraction detection results



从左到右依次采用引物 H1~H15 (左) 和 H16~H30 (右) 扩增, 每个引物扩增 4 个样本 (3、18、42、59)
Four samples 3, 18, 42, 59 amplified by each primer (randomly selected, from left to right were H1—H30)

图 2 引物 ISSR-PCR 扩增

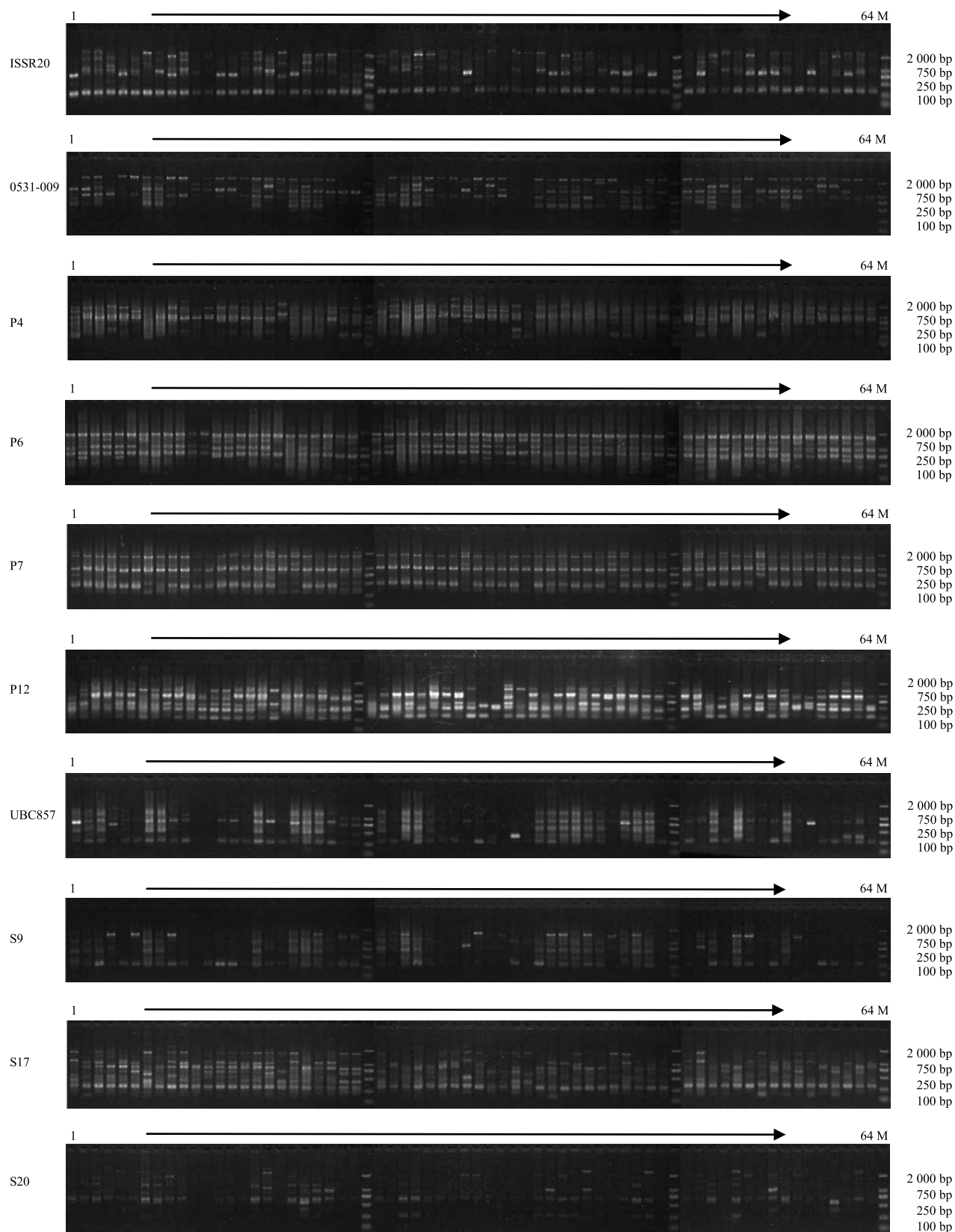
Fig. 2 ISSR-PCR amplification of primer

利用 Popgene 1.32 软件对 64 个三叶青种质的遗传多样性进行分析, 其平均检测等位基因数 (N_a) 为 1.943 1, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.381 08, 平均 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.242 98, 平均 Shannon 多样性指数 (I) 为 0.385 83 (表 3), 表明三叶青 64 个品种资源基因组 DNA 的多态性较高, 基因库较为丰富。

2.4 亲缘关系分析

利用“0”“1”数据, 利用 NTSYS 软件计算样品间的 GS 值, 得到供试材料遗传相似矩阵。GS 值越大, 表明亲缘关系越近, GS 值越小, 表明亲缘关系越远。根据 GS 值矩阵, 利用 UPGMA 法对 64 份供试材料的 ISSR 数据的结果进行聚类分析 (图 4)。结果显示, 供试材料的 GS 值的变异范围为 0.431 8~

0.988 6。在 GS 值为 0.637 3 处, 64 份供试材料可分为 2 组, 第 1 组材料为 23 (广西龙胜花坪红毛冲) 和 24 (云南麻栗坡中寨村), 其余 62 份供试材料归为第 2 组; 在 GS 值为 0.676 6 处, 64 份供试材料可分为 4 组, 第 1 组为 1 (江西怀玉山太阳坑)、45 (浙江丽水莲都东西岩)、32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、55 (浙江舟山白泉镇)、59 (浙江开化洪源) 和 44 (浙江宁波天童寺钟乐海); 第 2 组为 4 (湖南吉首德夯); 第 3 组为 23 (广西龙胜花坪红毛冲) 和 24 (云南麻栗坡中寨村), 其余 54 份供试材料归为第 4 组。在遗传相似性系数为 0.715 5 处, 64 份供试材料可分为 6 组, 第 1 组为 1 (江西怀玉山太阳坑) 和 45 (浙江丽水莲都东西岩); 第 2 组为 32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、



从左到右依次为样本 1~64 M-Marker
From left to right were samples numbered 1—64 M-Marker

图 3 10 对引物 (ISSR20、0531-009、P4、P6、P7、P12、UBC857、S9、S17、S20) 的 ISSR 扩增图谱
Fig. 3 ISSR amplification of 10 pairs of primers (ISSR20, 0531-009, P4, P6, P7, P12, UBC857, S9, S17, and S20)

表 3 10 对引物 ISSR-PCR 扩增的多态性
Table 3 Polymorphism of 10 pairs of primers amplified by ISSR-PCR

引物名称	数量	N_a	N_e	H	I	多态位点	多态百分数/%
ISSR20	64	2±0	1.351 1±0.202 0	0.245 8±0.105 6	0.403 0±0.135 1	10	100.00
P4	64	2±0	1.360 4±0.289 3	0.238 6±0.142 0	0.388 9±0.174 6	8	100.00
P6	64	1.714 3±0.488 0	1.306 2±0.340 1	0.196 9±0.173 4	0.313 8±0.248 7	5	71.43
P7	64	1.800 0±0.421 6	1.202 2±0.290 2	0.135 3±0.154 5	0.228 4±0.221 1	8	80.00
P12	64	2±0	1.630 6±0.425 8	0.342 5±0.199 5	0.500 2±0.257 4	7	100.00
UBC857	64	2±0	1.401 9±0.345 9	0.249 6±0.168 7	0.395 7±0.212 3	10	100.00
0531-009	64	2±0	1.527 9±0.290 7	0.323 7±0.136 7	0.493 4±0.170 8	7	100.00
S9	64	2±0	1.419 8±0.277 7	0.272 5±0.135 1	0.432 2±0.168 4	9	100.00
S17	64	1.916 7±0.288 7	1.344 1±0.296 6	0.223 8±0.161 9	0.357 2±0.223 3	11	91.67
S20	64	2±0	1.266 6±0.147 6	0.201 1±0.092 8	0.345 5±0.127 4	8	100.00

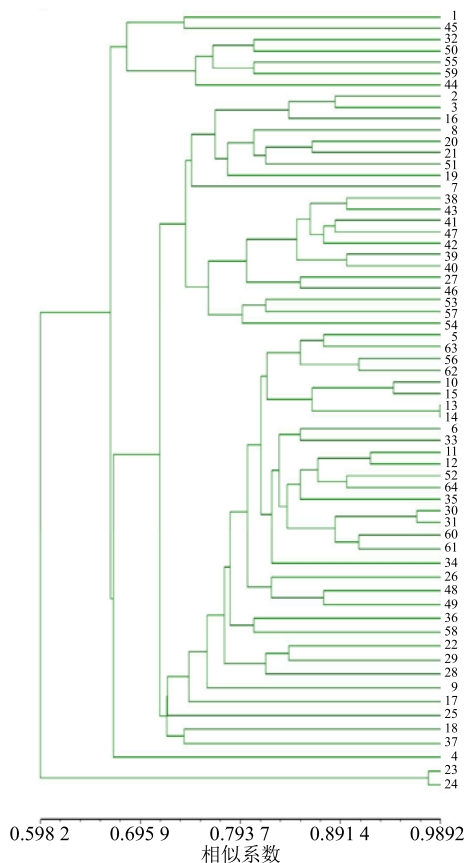


图 4 64 个三叶青种质基于遗传相似系数的聚类分析 (UPGMA)

Fig. 4 Cluster analysis of 64 *T. hemsleyanum* germplasm based on genetic similarity coefficient (UPGMA)

55 (浙江舟山白泉镇)、59 (浙江开化洪源) 和 44 (浙江宁波天童寺钟乐海); 第 3 组为 4 (湖南吉首德夯); 第 4 组为 23 (广西龙胜花坪红毛冲) 和 24 (云南麻栗坡中寨村); 第 5 组为 2 (湖北永州黄田铺)、3 (重庆药用植物园)、16 (广西乐业龙角山)、8 (湖南沅陵清水坪)、20 (贵州黄果树景区)、21 (广西龙胜银水侗寨)、51 (江

西丰城市玉华山)、19 (广西桂林植物研究所)、7 (湖南怀化绥宁县党坪)、38 (浙江宁波天童寺南山)、43 (江西玉山必姆坳村)、41 (江西玉山横街清溪)、47 (福建武夷山天心永乐寺)、42 (安徽黄山玉屏景区)、39 (江西弋阳三县岭)、40 (江西怀玉山金刚峰)、27 (贵州湄潭茅坪)、46 (浙江富阳新登外官)、53 (安徽黄山凤凰源景区)、57 (江西安远老鼠嘴)、54 (江西贵溪樟坪畲族乡), 其余 33 份供试材料归为第 6 组。可见, 64 份三叶青种质遗传多样性十分丰富, 不同种质之间的遗传信息有一定差异。

2.5 64 个三叶青种质资源的 DNA 指纹图谱

根据 PCR 扩增结果, 以 10 对引物 (ISSR20、0531-009、P4、P6、P7、P12、UBC857、S9、S17、S20) 的扩增电泳图为基础, 用 quantityone 软件绘制 64 个三叶青种质资源的 DNA 指纹图谱 (图 5)。根据 10 个 ISSR 引物的扩增结果, 筛选出引物 ISSR20、UBC857 和 S17 扩增的 DNA 指纹图谱可用于 64 个三叶青种质的鉴定。

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 一个物种的遗传多样性越丰富, 适应环境变化的能力就越强^[14]。遗传多样性的研究可用于调查植物居群的交配系统及居群内个体间彼此的分化或亲近程度, 有利于正确制定植物遗传资源的原位保存和收集的策略^[15]。遗传多样性的分析一般主要借助于同工酶等生化标记以及 DNA 分子标记的方法, 近年来, DNA 分子标记技术不断完善, 从而在 DNA 水平上对植物的遗传多样性进行快速、可靠、有效鉴定成为可能^[16]。ISSR 分子标记是一种基于微卫星序列发展起来的分子标记, 具有简便迅速、稳定高效、DNA 多态性高, 结合了 SSR 标记和 RAPD 标

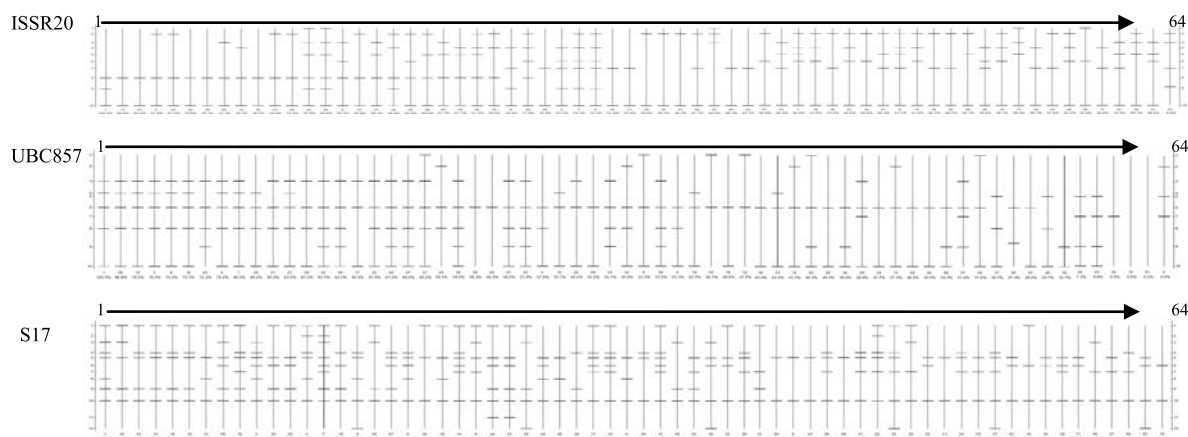


图 5 基于 3 对引物 (ISSR20、UBC857 和 S17) 的 64 个三叶青种质资源 DNA 指纹图谱

Fig. 5 DNA fingerprint of 64 *T. hemsleyanum* germplasm resources based on three pairs of primers

记的优点,克服了 RFLP 技术的局限性以及 RAPD 的假阳性等^[17]。蹇京蓉^[18]报道三叶青有紫藤三叶青和青色藤三叶青 2 个品种。现有研究表明,紫藤三叶青分布于江西、浙江山区,属正宗品种,而青色藤三叶青分布于福建、湖南、四川、广东、广西、云南等地,2 个品种生长的地域界限分明,不混合生长^[19-20]。朱波等^[12]用 ISSR 法将 24 份三叶青种质资源分成 4 大类,第 I 类以浙江种质为主,第 II 类以江西、广西、湖北、湖南种质为主,第 III 类包括湖南怀化与广西钟山 2 个种质。而本研究中,在 GS 为 0.676 6 处,64 份供试材料(野生种)可分为 4 组,第 1 组为 1 (江西怀玉山太阳坑)、45 (浙江丽水莲都东西岩)、32 (江西井冈山)、50 (宁波市天童寺小天童)、55 (浙江舟山白泉镇)、59 (浙江开化洪源)和 44 (浙江宁波天童寺钟乐海),第 2 组为 4 (湖南吉首德夯),第 3 组为 23 (广西龙胜花坪红毛冲)和 24 (云南麻栗坡中寨村),其余 54 份供试材料归为第 4 组。由此可见,江西主要种质和浙江主要种质聚为一类,广西、湖南和云南的种质聚为一类,这也在分子水平上印证了江西、浙江种质属同一种质以及福建、湖南、四川、广东、广西、云南等地种质属同一种质的观点^[20-21]。Peng 等^[13]分别对三叶青 27 份种质进行了遗传多样性 ISSR 分析和 SRAP 分析,结果表明,ISSR 和 SRAP 分析分别得到 112 和 66 条扩增条带,多态性百分比较低,分别为 85.71%和 77.27%。栽培群体间的遗传相似性远高于野生群体,基因流水平低、距离隔离和无性繁殖可能与种群分化程度低有关。而在本实验中,ISSR20、0531-009、P4、P6、P7、P12、UBC857、S9、S17、S20 10 条引物在 64 个三叶青种质中共扩

增出了 83 个多态位点,多态百分数为 71.43%~100%,平均多态百分数为 94.31%,表明三叶青 64 个品种资源基因组 DNA 的多态性较高,基因库较为丰富。

程林等^[21]和宋亚玲等^[22]采用超高效液相色谱建立了三叶青叶的指纹图谱。DNA 指纹图谱是指 DNA 样品用特定分子标记技术处理显示出具有特定 DNA 片段的总称^[23-24]。利用分子标记构建 DNA 指纹图谱,就是利用量少的标记来区别量大的品种,这就需要 DNA 分子标记的多态性要好^[25]。目前,构建植物分子指纹图谱主要有特征谱带法、引物组合法和单引物方法 3 种方式^[26]。本实验采用引物组合法,利用 3 条多态性丰富且鉴别力强的引物 (ISSR20、UBC857 和 S17) 构建了 64 份三叶青种质资源的 DNA 指纹图谱,每份种质的指纹图谱都是唯一的,为三叶青种质鉴定、新品种登记提供了参考依据。今后随着三叶青种质资源数量的不断增加,这 3 条引物 (ISSR20、UBC857 和 S17) 可能不足以鉴定区分,可根据具体情况适当增加具有鉴别力引物的数量,或选择新的分子标记技术,以进一步补充本研究初步建立的 64 份三叶青种质的 DNA 指纹图谱。

参考文献

- [1] 汪舍平,徐建春,张亮亮,等.不同栽培生境对三叶青生长及微量元素和总黄酮含量的影响[J].浙江农业科学,2017,58(12):2177-2178.
- [2] 张祺箐,冯正权.三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠脾脏单个核细胞 PGE2、COX-2 表达的影响[J].浙江中西医结合杂志,2017,27(10):842-845.
- [3] 陈红,廖淑彬,陈丹,等.闽产三叶青地上部分抗炎提取物的急性毒性研究[J].福建医科大学学报,

- 2017, 51(5): 287-290.
- [4] 吴志庄, 高贵宾, 欧建德, 等. 生物炭肥对毛竹林下三叶青叶绿素含量、光合与荧光特性的影响 [J]. 西北林学院学报, 2017, 32(5): 59-63.
- [5] 周武, 张善华. 不同有机肥对药用植物三叶青化感物质的影响 [J]. 丽水学院学报, 2017, 39(2): 66-71.
- [6] 王静, 郭万里, 孔亚泽, 等. 珍稀药用植物三叶青的高效微繁体系研究 [J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2016, 35(4): 636-642.
- [7] 钟良瑞, 陈华, 景晶, 等. 三叶青黄酮抑制肺癌 A549 细胞生长与蛋白酶体活性的关系研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(10): 1123-1126.
- [8] 于虹敏, 贺文达, 刘巧, 等. UFLC-DAD 法同时测定三叶青中原花青素 B1 和儿茶素含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 71-73.
- [9] 范世明, 谢心月, 曾繁天, 等. 三叶青叶化学成分鉴定及其总黄酮含量测定研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1481-1488.
- [10] 于虹敏, 贺文达, 刘巧, 等. UFLC-DAD 法同时测定三叶青中原花青素 B1 和儿茶素含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 71-73.
- [11] 郝久程, 贾鑫, 穆晓红, 等. 大连地区岛屿与大陆玉竹种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物研究, 2017, 37(5): 709-714.
- [12] 朱波, 华金渭, 刘昆, 等. 珍稀药材三叶青种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(5): 914-919.
- [13] Peng X, Ji Q Y, Fan S W, Zhang Y J, *et al.* Genetic diversity in populations of the endangered medicinal plant *Tetrastigma hemsleyanum* revealed by ISSR and SRAP markers: Implications for conservation [J]. *Gene Res Crop Evol*, 2015, 62(7): 1069-1078.
- [14] 马丽, 侯乐峰, 郝兆祥, 等. 82 个石榴品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 果树学报, 2015, 32(5): 741-750.
- [15] 陈永久, 王文, 杨跃雄, 等. 冬虫夏草的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化 [J]. 遗传学报, 1997, 24(5): 410-416.
- [16] 汪斌, 祁伟, 兰涛, 等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱 [J]. 作物学报, 2011, 37(6): 1116-1123.
- [17] 李钰莹, 董宽虎. 山西白羊草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 草业学报, 2014, 23(1): 217-222.
- [18] 蹇京蓉. 中药三叶青资源状况及其对策研究 [J]. 中国药物经济学, 2012, 7(2): 228-230.
- [19] 李朝奎. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [20] 钱丽华, 戴丹丽, 姜慧燕, 等. 濒危药用植物三叶青研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(7): 1301-1308.
- [21] 程林, 胡铁娟, 浦锦宝, 等. 三叶青的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(4): 296-298.
- [22] 宋亚玲, 向太和, 武盼, 等. 三叶青扩展蛋白家族基因全长 cDNA 的克隆及其生物信息学和表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 810-815.
- [23] 张煜炯, 彭昕, 吉庆勇, 等. 聚类分析和主成分分析法研究三叶青氯仿部位 HPLC 指纹图谱 [J]. 中成药, 2016, 38(3): 607-612.
- [24] 陈志丹, 孙威江, 项丽慧, 等. 应用 ISSR 指纹图谱鉴定铁观音茶树 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(12): 2803-2810.
- [25] 张安世, 韩臣鹏, 齐秀娟, 等. 基于 ISSR 标记的猕猴桃品种遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. 植物资源与环境学报, 2017, 26(3): 19-26.
- [26] 查美琴, 赵玉玲, 李疆, 等. 新疆枸杞种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1065-1071.