

观赏贝母种质亲缘关系的 ISSR 分析

吴晓清^{1,2}, 成海钟¹, 周玉珍¹, 娄晓鸣¹, 张文婧¹, 汤庚国²

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏 苏州 215008; 2. 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要:利用 ISSR 标记对 22 份观赏贝母材料进行了基因组多态性分析, 从 100 条引物中筛选出 13 条用于观赏贝母的 ISSR 扩增。共扩增出 178 条带, 其中多态性条带 160 条, 多态性百分率为 90%。根据 ISSR 扩增结果, 利用 NTSYSpc 2.10e 软件进行 Jaccard 相似性系数分析, 22 份观赏贝母的遗传相似系数为 0.2338~0.8788。通过 UPGMA 进行聚类分析, 探索亲缘关系。在遗传相似系数 0.50 处, 22 份观赏贝母材料可分为二大类群。第一大类包括比较原始的贝母组和特化的聚花组和单鳞组的贝母; 第二大类包括演化水平较高的多鳞组的 3 种贝母。由此可见, 同一组观赏贝母种质之间表现较近缘的亲缘关系。

关键词:观赏贝母; ISSR; 亲缘关系; 聚类分析

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0157-04

贝母属(*Fritillaria* L.)是狭义百合科(Liliaceae)中最大的一个属, 是一类重要的药用和观赏植物^[1]。贝母是百合科贝母属的球根花卉, 我国多作为药用。近年来, 欧美国家以观赏为目的, 用于庭院环境布置, 或盆栽观赏^[2]。观赏贝母类自然种质资源丰富, 植株茎秆挺拔, 高度因种类、品种而异, 可视目的不同而适地、适时选用; 叶片青翠, 花姿奇特, 色彩丰富。花期 3~6 月, 是早春初夏园林花卉的佼佼者。其中尤以花贝母观赏价值最高, 育成的品种也最多。高杆品种适用于庭院种植或切花栽培, 矮杆品种则适合盆栽, 观赏性极强。因此贝母属植物具有潜在的资源优势和广泛的利用前景, 利用分子标记分析观赏贝母种间亲缘关系, 对观赏贝母优良品种的选育和产业化开发具有重要作用。

ISSR(Inter Simple Sequence Repeat, 简单重复序列区间)分子标记是一种以微卫星序列为引物, 进行多位点 PCR 扩增的技术。该技术克服了 RFLP、RAPD、AFLP 等标记技术的一些局限性, 具有无需预知基因组背景信息、DNA 样品用量少、操作简单、试验重复性好、信息量大、多态性高和试验成本低等优点, 很快被运用于种质收集^[3]、品种鉴定^[4]、遗传多样性^[5]、系统进化关系^[6]、遗传作图^[7]等研究中, 并且在园艺植物研究中也显

示出独特的优势^[8]。该试验利用已优化好的观赏贝母 ISSR 反应体系, 从分子水平上探讨 22 份观赏贝母资源的亲缘关系, 为新品种的选育提供理论依据, 为从分子水平进行品种鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 22 份观赏贝母种质资源(表 1)均取自苏州农业职业技术学院园艺中心。采摘的观赏贝母嫩叶置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥, 4℃保存。

1.2 试验试剂

试验所用的 *Taq* 酶、dNTP、琼脂糖购自上海鼎国有限公司; ISSR 引物、MgCl₂、PCR Buffer、DNA marker (DL2000)购自上海生工生物工程公司。ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, UBC)所设计的引物。

1.3 总 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法提取基因组 DNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳定性检测 DNA 质量, 分光光度法定量测定浓度及纯度, 并将其稀释至 10 ng/μL 备用。

1.4 ISSR-PCR 扩增

在 Eppendorf PCR 仪上扩增, 反应体系为 20 μL, 包括水 7.4 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, Mg²⁺ 2 μL (2.5 mmol/L), dNTP 1.6 μL (0.2 mmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 1 μL (2 U), 引物 5 μL (0.5 μmol/L), 模板 1 μL (10 ng)。PCR 扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 40 s, 57.9℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 循环 38 次; 72℃延伸 8 min; 4℃保存。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)中电泳, 用上海天能公司生产的凝胶成像系统观察照相。

第一作者简介:吴晓清(1985-), 女, 山东淄博人, 在读硕士, 现主要从事植物系统与进化研究工作。E-mail: wxqhaohaizi@126.com。

通讯作者:成海钟(1954-), 男, 本科, 教授, 研究方向为植物系统与进化。E-mail: sn1907@163.com。

基金项目:江苏省农业三项工程资助项目(SX(2007)907); 苏州市自然科学基金资助项目(YJG0906)。

收稿日期:2010-05-25

1.5 数据分析

根据各分子标记在相同电泳迁移率(相同分子量片段)的有无统计得到所有位点的二元数据,有 DNA 扩增带记为 1,无带记为 0。利用 NTSYSpc 2. 10e 软件进行 Jaccard 相似性系数分析,并通过非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,建立亲缘关系图。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

由 5 号材料(波斯贝母)对 ISSR 引物进行筛选,从中选出 13 条引物用于观赏贝母材料的 ISSR 扩增(表 2),它们扩增的谱带清晰,且多态性丰富(图 1~2)。13 条引物共扩增出 178 条带,其中多态性条带 160 条,多态性百分率为 90%。单条引物扩增的条带为 7~19,平均 12 条。扩增产物长度介于 200~2 000 bp。扩增条带数

最多的引物为 UBC808,达 19 条,扩增条带数最少的引物为 UBC881,扩增出的条带为 7 条。其中,多态性百分率最高的为 UBC868、UBC811、UBC808 达 100%,最低的为 UBC900,为 71. 4%。可见,ISSR 检测观赏贝母遗传多样性的效率很高,也表明观赏贝母的遗传多样性极为丰富。

2.2 聚类分析

22 份观赏贝母材料的遗传相似系数为 0. 2338~0. 8788。在所有试验材料中相似系数最大的是来自荷兰的波斯贝母的 2 个品种阿尔巴和象牙钟,为 0. 8788,说明二者的亲缘关系较近;相似系数最小的是来自荷兰的米贝母和来自新疆的托里贝母,为 0. 2338,说明二者的遗传差异较大。

由图 3 可知,22 份种质材料在相似系数 0. 50 水平

表 1 用于 ISSR 分析的观赏贝母材料

编号	种名	拉丁名	引种来源
1	波斯贝母阿尔巴	<i>F. persica</i> ‘Alba’	荷兰
2	米贝母	<i>F. davidii</i>	荷兰
3	波斯贝母象牙钟	<i>F. persica</i> ‘Lovry Bells’	荷兰
4	皇冠贝母	<i>F. imperialis</i> ‘Slagzwaard’	荷兰
5	波斯贝母	<i>F. persica</i>	荷兰
6	展瓣贝母	<i>F. raddeana</i>	荷兰
7	皇冠贝母帝国鲁布拉	<i>F. imperialis</i> ‘Rubra Maxima’	荷兰
8	皇冠贝母帝国淑女	<i>F. imperialis</i> ‘Maxima lutea’	荷兰
9	托里贝母	<i>F. tortifolia</i>	新疆
10	安徽贝母	<i>F. anhuiensis</i>	安徽
11	浙贝母	<i>F. thunbergii</i>	浙江
12	裕民贝母	<i>F. stenantha</i>	新疆
13	黄花贝母	<i>F. verticillata</i> var. <i>thunbergii</i>	新疆
14	伊犁贝母	<i>F. pallidiflora</i>	新疆
15	绿黄贝母	<i>F. cirrhosa</i> var. <i>viridiflava</i>	新疆
16	紫花贝母	<i>F. cirrhosa</i> var. <i>purpurea</i>	新疆
17	弯尖贝母	<i>F. acmopetala</i> ssp. <i>wendelboi</i>	荷兰
18	堪察加贝母	<i>F. camschatcensis</i>	荷兰
19		<i>F. uxor-culpis</i>	荷兰
20		<i>F. elwesii</i>	荷兰
21	小白花贝母	<i>F. albidiflora</i>	新疆
22	弯尖贝母	<i>F. acmopetala</i> ‘Brunette’	荷兰

表 2 13 个引物碱基序列和扩增的 DNA 片段数

引物	序列	扩增条带数	多态条带数	多态条带百分率/%
UBC873	(GACA) ₄	15	13	86. 67
UBC868	(GAA) ₆	12	12	100
UBC808	(AG) ₈ C	15	13	86. 67
UBC886	VDV(CT) ₇	14	13	92. 86
UBC811	(GA) ₈ C	15	15	100
UBC808	(AG) ₈ YC	19	19	100
UBC861	(ACC) ₆	16	15	93. 75
UBC881	(GGGT) ₃ G	8	7	87. 5
UBC900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	14	10	71. 43
UBC810	(GA) ₈ T	14	11	78. 57
UBC834	(AG) ₈ YT	11	9	81. 82
UBC842	(GA) ₈ YG	14	13	92. 86
UBC895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	11	10	90. 91

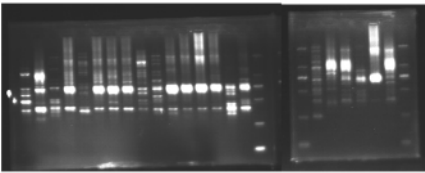


图 1 引物 873 对 22 份 DNA 样品扩增结果

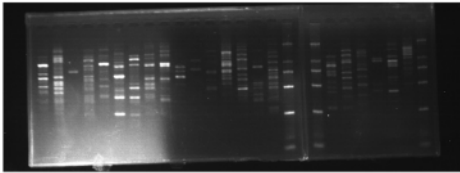


图 2 引物 810 对 22 份 DNA 样品扩增结果

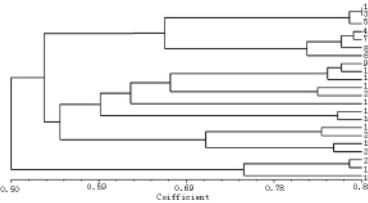


图 3 根据 ISSR 结果构建的 22 份观赏贝母材料的亲缘关系树状图

1. 0.000000
0.4969364 1. 0.000000
0.8787879 0. 4848485 1. 0.000000
0.6960606 0. 5233030 0. 6466667 1. 0.000000
0.8701269 0. 5254605 0. 5647179 0. 6666667 1. 0.000000
0.6883117 0. 5837446 0. 7488177 0. 8271429 0. 7748918 1. 0.000000
0.6147126 0. 4283714 0. 6332035 0. 5781259 0. 6836787 0. 7792328 1. 0.000000
0.6884804 0. 5854805 0. 6438938 0. 8424719 0. 4732477 0. 8228128 0. 8328129 1. 0.000000
0.5461285 0. 2337862 0. 4493177 0. 4878365 0. 4803165 0. 4483874 0. 5281385 0. 4848485 1. 0.000000
0.4978365 0. 3863809 0. 5461128 0. 5354805 0. 5234678 0. 5844136 0. 4882138 0. 2487532 1. 0.000000
0.5021645 0. 3248753 0. 4544480 0. 5233893 0. 4678325 0. 4467320 0. 5467825 0. 5854805 0. 8338268 0. 2948723 1. 0.000000
0.6147126 0. 4372294 0. 6124718 0. 5461128 0. 5808846 0. 5346789 0. 5854805 0. 5238076 0. 6193847 0. 4761908 0. 6709687 1. 0.000000
0.5714286 0. 2887013 0. 5448446 0. 5351315 0. 5454645 0. 5108228 0. 5461128 0. 5238076 0. 8371429 0. 3118888 0. 8441389 0. 7482897 1. 0.000000
0.5900754 0. 4671823 0. 5358446 0. 4483874 0. 5878936 0. 4978365 0. 4838066 0. 6021736 0. 5334678 0. 5714286 0. 6888887 0. 6388887 1. 0.000000
0.5714286 0. 5238076 0. 5978428 0. 5461128 0. 5808846 0. 5541126 0. 4978365 0. 5238076 0. 5627706 0. 5281385 0. 5844136 0. 6103896 0. 6388887 1. 0.000000
0.5461456 0. 5531315 0. 5387446 0. 4978365 0. 5714286 0. 5281385 0. 4718615 0. 4678365 0. 5422776 0. 5354645 0. 5838736 0. 6342436 0. 6320346 0. 5823819 1. 0.000000
0.4848485 0. 5687365 0. 5118828 0. 5467825 0. 5108228 0. 5808846 0. 5870966 0. 5838736 0. 4467328 0. 5714286 0. 5531315 0. 5334678 0. 5464846 0. 5844846 0. 5334678 1. 0.000000
0.5627706 0. 7873758 0. 6124718 0. 5384446 0. 6468266 0. 6233768 0. 4718615 0. 5844136 0. 3483203 0. 7448387 0. 4339134 0. 3678966 0. 4372294 0. 5281385 0. 5687365 0. 5787376 0. 5324678 1. 0.000000
0.5384446 0. 4483874 0. 5547826 0. 5387446 0. 5387446 0. 5384446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 0. 5387446 1. 0.000000
0.5841126 0. 5531315 0. 5541126 0. 5324678 0. 5808846 0. 5887446 0. 5461126 0. 5844136 0. 5387446 0. 5714286 0. 5870966 0. 5844136 0. 5938736 0. 5844136 0. 6369887 0. 5838736 0. 5448446 1. 0.000000
0.5467825 0. 5454805 0. 5938736 0. 5627706 0. 5878966 0. 5497836 0. 4884805 0. 5841126 0. 4621736 0. 5238076 0. 5231388 0. 4193847 0. 6326787 0. 4647136 0. 4732477 0. 5384846 0. 6888887 0. 5938736 0. 5874826 1. 0.000000
0.5388225 0. 4883874 0. 4938066 0. 4881778 0. 5108228 0. 5346789 0. 5238076 0. 5461126 0. 5387446 0. 5194808 0. 6333896 0. 5234678 0. 5787376 0. 5627706 0. 4881778 0. 5334678 0. 8384978 0. 8324678 0. 6193847 0. 7318817 0. 5281388 1. 0.000000

图 4 供试 22 份材料间 Jaccard 相似系数

号波斯贝母遗传相似系数较大,为 0.8701。12 号裕民贝母与 17 号弯尖贝母遗传相似系数较小,为 0.2727。在第二大类中,2 号 *F. davidii* 与 10 号 *F. anhuiensis* 遗传相似系数最大,为 0.8528,10 号 *F. anhuiensis* 与 18 号 *F. Camschatcensis* 遗传相似系数较小,为 0.8009(图 4)。

3 讨论

国内外利用分子生物学方法对贝母的遗传多样性研究不多^[9-13]。国内对贝母属植物的研究多集中在贝母资源调查、化学成分分析、药理作用研究以及成分含量测定等方面。

贝母属(*Fritillaria* L.)是狭义百合科(Liliaceae)中最大的一个属,与百合属(*Lilium*)最为近缘。全属约 130 种,分为 5 组^[14]:贝母组 *Sect. Fritillaria*、多花组 *Sect. Rhinopetalum*、聚花组 *Sect. Petillium*、单鳞组 *Sect. Theresia*、多鳞组 *Sect. Liliorhiza*。从聚类结果可知,浙贝母和来自新疆的贝母亲缘关系较近,属于贝母组。贝母组是贝母属中最大的一个组,分布欧洲和亚洲的温带地区,分布范围约为北纬 26°~60°,是贝母属中原始的类群。其中裕民贝母和小白花贝母、浙贝母、黄花贝母、托里贝母亲缘关系较近,段咸珍^[15]描述小白花贝母与裕民贝母外形形态相似,仅以花白色,蜜腺窝圆形,绿色,柱头裂片长 2 mm 而不同于后者,小白花贝母因外形形态相似在我国长期被误认为黄花贝母,并且混生于黄花贝母丛间,

数量稀少,地理上没有隔离,花期也一致。托里贝母与黄花贝母分布范围一致,部分特征相同。李萍^[16]等研究贝母属花粉形态中也发现小白花贝母与裕民贝母花粉形态类似,二者花粉表面均有网状纹饰,其网眼大小,单位面积网眼数,网脊组成及宽度几乎相同。罗毅波^[17]提出 *F. tortifolia*、*F. albidiflora* 等一系列变种名称,主要是根据花的变异而成立的,认为这些变异多发生在栽培条件下,没必要给予其分类名称。该试验发现它们的电泳图谱有所差别,但亲缘关系较近。浙贝母从外部形态上看与黄花贝母非常相似,聚类图上也显示了其较近的亲缘关系。原产于云南的绿黄贝母和紫花贝母亲缘关系较近,李萍^[18]通过对云南贝母属药用植物叶表面扫描电镜观察,发现绿黄贝母和紫花贝母群近缘,叶表面细胞多为长方形,但角质纹理不同是其分类的依据,这与花粉形态观察相吻合。对于弯尖贝母以往研究的较少,该试验发现其种内相似度高,与 *F. wuxia-vulpis*、*F. elwesii* 有较近关系,外部形态上有相似的特征。波斯贝母 3 个种聚在一起,亲缘关系近,它们同属于单鳞组,是西亚的一个特有组,鳞茎仅具 1 枚鳞片,花 6~24 朵,有时可达 30~34 朵,排成总状花序,花较小,具苞片或无苞片;茎生叶多数、互生。主要分布于土耳其南部,叙利亚、伊拉克、黎巴嫩、约旦、以色列、塞浦路斯以及伊朗南部。皇冠贝母的 3 个品种和展瓣贝母亲缘关系较近,它们同属

于聚花组。皇冠贝母分布范围较大,从土耳其东南部一直向东延伸到伊朗境内的扎格罗斯山脉约北纬 30°左右。再从伊朗经阿富汗、巴基斯坦延伸到印度的克什米尔地区,以及原苏联中亚的布哈拉山脉。展瓣贝母则主要分布在里海东南部山地。该组鳞茎大,具 4~5 枚鳞片,花多朵,集生茎顶形成伞形花序;叶多枚,多轮生。聚花组和单鳞组贝母都是较进化的种,从原始贝母组特化而来。最后是米贝母、安徽贝母表现出较近的亲缘关系,李萍等研究花粉形态时提出安徽贝母与米贝母花粉形态也有共同之处,网脊均由 1~2 行颗粒组成,大网眼与成群、成行小网眼相间排列,或被其包围。勘察加贝母与安徽贝母、米贝母聚在一起,它们同属于多鳞组,该组鳞茎由多枚鳞片呈覆瓦状排列,是贝母属与百合属 *Lilium* 鳞茎最为接近的类型。此外,该组中的 *F. camschatcensis*,其花被片基部的蜜腺呈浅沟状,没有明显的蜜腺窝。因此,该种被不少学者放在百合属中,但该种的柱头式样却与典型的贝母属相同,而与百合属不同。表明该种是处于贝母属和百合属之间的一个类型。该试验发现同一组的观赏贝母种质之间表现较近缘的亲缘关系,较原始的贝母种群聚在一起,而相对较进化的种聚在一起,并且验证了形态学、细胞学及孢粉学上的分类结果。此外,为更好的解决生产、科研中存在的问题,在今后贝母的亲缘关系分析中,可以将 ISSR 方法与染色体核型、同工酶谱带及其它的分子标记(如 AFLP)等多种方法的研究互为补充。

参考文献

- [1] 梁松筠. 百合科(狭义)植物的分布区对中国植物区系研究的意义[J]. 植物分类学报, 1995, 33(1): 27-51.
- [2] 娄晓鸣, 成海钟, 朱旭东. 观赏贝母花粉生活力及贮藏性研究[J]. 江苏农业科学, 2007(1): 101-102.
- [3] Charters Y M, Wilkinson M J. The use of self-pollinated progenies as

- “in-groups” for the genetic characterization of coco germplasm [J]. Theor. Appl. Genet., 2000, 100(1): 160-166.
- [4] Kumar L D, Kathirvel M, Rao G V, et al. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum* L.) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays [J]. Forensic Sci Int., 2001, 116(1): 63-68.
- [5] 缪恒彬. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1243-1248.
- [6] 罗瑜萍, 龚维, 邱英雄, 等. 羊蹄甲属 3 种园艺树种分子鉴定及亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 433-436.
- [7] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 96: 37-45.
- [8] 赵谦. ISSR 在蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2007, 22(4): 66-70.
- [9] 卞云云, 李萍, 高志千, 等. RAPD 技术在中药贝母类研究中的应用[J]. 中药材, 2000, 23(1): 13-16.
- [10] 李玉锋, 唐琳, 陈放. 8 种贝母的 RAPD 分析[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1528-1529.
- [11] 陆含, 朱世华, 周书君, 等. 浙贝母 4 品种及 5 种贝母遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 宁波大学学报, 2009, 22(1): 44-47.
- [12] 蔡朝晖, 李萍, 董婷霞, 等. 贝母分子生物学鉴定方法的研究[J]. 药学报, 2000, 35(4): 309-312.
- [13] 尹春萍, 刘文涛, 徐顺清, 等. 湖北贝母与川贝母随机扩增引物 DNA 的鉴别[J]. 医药导报, 2007, 26(4): 359-361.
- [14] Turrill W B, Sealy J R. Studies in the genus *Fritillaria* (Liliaceae) [J]. Hooker, s. Icones Plantarum, 1980, 39(1-2): 1-280.
- [15] 段咸珍, 郑秀菊. 国产多轮贝母订正[J]. 云南植物研究, 1991, 13(1): 14-16.
- [16] 李萍, 濮祖茂. 中国贝母属花粉形态的研究[J]. 云南植物研究, 1991, 13(2): 43.
- [17] 罗毅波, 陈心启. 新疆贝母属的订正[J]. 植物分类学报, 1996, 34(1): 77-85.
- [18] 李萍, 蒋鑫. 贝母属植物叶表面显微观察研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(4): 205-211.

(致谢: 苏州大学蚕丝生物技术实验室提供试验条件。)

Analysis of Genetic Relationship Ornamental *Fritillaria* Germplasm Resources by ISSR Markers

WU Xiao-qing^{1,2}, CHENG Hai-zhong¹, ZHOU Yu-zhen¹, LOU Xiao-ming¹, ZHANG Wen-jing¹, TANG Geng-guo²

(1. Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: 22 Ornamental *Fritillaria* germplasm were used as materials for analyzing their genome polymorphism by ISSR markers. 13 primers selected from 100 primers were used for ISSR amplification. A total of 178 bands were generated, of which 160 bands were polymorphic bands (the percentage of polymorphic band, PPB=90%). According to the results of ISSR amplification, which were analyzed to Jaccard similarity coefficient by NTSYSpc 2.10e software, the genetic similarity coefficient was 0.2338 to 0.8788. The clustering dendrogram was constructed by UPGMA method. 22 Ornamental *Fritillaria* materials were divided into two major groups while the similarity coefficient was 0.50. The first group included original *Sect. Fritillaria*, evolved *Sect. Petillium* and *Sect. Theresia*. The second group included 3 ornamental *Fritillaria* in more evolved *Sect. Liliorhiza*. The species in one sect had closer phylogenetic relationship.

Key words: ornamental *Fritillaria*; ISSR; genetic relationship; cluster analysis