

# 利用 ISSR 分子标记对 39 份莲藕种质资源的遗传多样性分析

李 长 春, 戴 余 军, 苏 超, 李 建 华, 田 春 元, 姚 国 新

(孝感学院 生命科学技术学院 湖北 孝感 432000)

**摘 要:**采用 ISSR 分子标记技术对 39 份莲藕品种进行遗传多样性分析。结果表明:8 个 ISSR 引物共扩增出 89 条带,其中有 55 条多态带,平均每个引物扩增的多态性带数为 6.88 条,多态性比率平均为 61.8%;通过遗传相似系数和聚类分析,能将 39 份莲藕品种完全区分开;说明 ISSR 标记技术能较好地分子水平揭示出莲藕品种的遗传多样性。

**关键词:** 莲藕;遗传多样性;ISSR

**中图分类号:** S 682.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)12-0096-03

莲藕(*Nelumbo nucifera* Gaertn)属睡莲科莲属,是一种重要的水生经济作物,在食用、药用、美容健美、园林绿化以及外贸出口等方面有很大的应用价值和开发潜力<sup>[1-2]</sup>。经古植物学研究证明,莲属植物在被子植物大家族兴旺之前,距今约 1.35 亿年,在北半球许多水域地区已有生长分布,在长期的进化过程中出现了各种变异类型。莲藕在我国分布广泛,几乎遍布全国,栽培历史悠久,种质资源丰富,品种繁多,特别是近 30 a 经不同单位的选育与应用,莲藕品种已由 20 世纪 80 年代初的 100 多份衍生到目前的近 500 份,品种间存在系谱不清、同物异名等混乱现象,不利于莲藕的可持续利用<sup>[1,3]</sup>。传统分类主要是依据莲藕的形态特征来划分,受环境影响较大,鉴定困难。

ISSR 即简单重复序列区间(Inter-Simple Sequence Repeat)是由 Zietkiewicz 等 1994 年创建的一种分子标记技术<sup>[4]</sup>,它结合了 SSR 和 RAPD 的优点,以其多态性高,操作简单,可重复性强,而在水稻、小麦、青麻等不同作物遗传多样性分析、指纹图谱构建、品种鉴定等领域中被广泛应用<sup>[5-7]</sup>。现采用 ISSR 分子标记分析 39 份莲藕种质资源之间的遗传多样性,为合理选择莲藕育种的亲本和更好地利用现有的种质资源提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用的 39 份莲藕材料(表 1),除“白泡”、“三

五”和“武植二号”采自孝感外,其他材料均由武汉植物园提供,取幼嫩叶片置超低温冰箱中保存备用。Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker 购自上海生工生物工程技术有限公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

表 1 供试材料

样品编号	品种名称	样品编号	品种名称
1	白泡	21	小节白
2	三五	22	千瓣莲
3	武植二号	23	红千叶
4	青毛节	24	鸾凤玉
5	西施	25	飞蛾
6	西洋杯	26	牡丹种
7	长节六月报	27	泡子
8	娇阳	28	金辉
9	长瓣小桃红	29	州藕(食用)
10	台阁寿星	30	西安红莲
11	六月雪	31	赛菊
12	红楼	32	点绛红
13	绍兴红莲	33	太真出浴
14	毛节	34	大满江红
15	凤舞	35	嘉旦红
16	新加坡莲	36	爪红碗莲
17	新红	37	赛佛座
18	青鹤	38	彩虹
19	美中红	39	三色莲
20	醉杯		

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 采用改良的 CTAB 法提取莲藕幼嫩叶片中的 DNA<sup>[8]</sup>,用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度。

1.2.2 ISSR 引物合成 用于试验的 100 条 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学提供的序列,由上海英俊生物技术有限公司合成,用提取的莲藕 DNA 进行初步筛选。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 单管反应体系:20 μL 反应体系中,10× buffer 2.0 μL; MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL; dNTP 0.4 μL; primer 0.6 μL; Tap 酶 0.4 μL; Template (模板) 0.6 μL;

第一作者简介:李长春(1976-),男,湖北广水人,硕士,助教,研究方向为植物遗传与生物技术。E-mail:lec386@163.com。  
基金项目:湖北省教育厅优秀中青年人才资助项目(Q20102701);湖北省农业资源利用重点(培育)学科资助项目(鄂学位[2010]1号)。  
收稿日期:2011-03-21

去离子水 14.8  $\mu$ L。PCR 的扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 43 个热循环, 每个热循环包括: 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 结束循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增完成后, 用 1% 的琼脂糖 (含有 0.1% 的 EB) 凝胶电泳, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$  TBE, 在 120V 稳定电压的条件下, 电泳 2.0 h, 用凝胶成像系统照相保存。

1.2.4 数据统计与分析 ISSR 产生的系列谱带, 属于多位点、非特异性标记。电泳中的条带根据迁移率考带, 有条带的用“1”记录, 没有条带的用“0”记录, 用 NTSYS-pc 2.1 分析软件统计 39 份莲藕资源之间的遗传相似系数, 采用 UPGMA 法对其进行聚类分析, 并构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 莲藕 DNA 的 ISSR 多态性分析

随机挑取 3 个品种莲藕的基因组 DNA 对合成的 ISSR 引物进行了筛选, 从中筛选出 8 个扩增带型清晰、多态性较好的引物对 39 份莲藕材料进行多态性分析。从表 2 可知, ISSR 扩增统计中, 每个引物可扩增出 7~14 条 DNA 谱带, 平均每个引物扩增 11.1 条 DNA 谱带, 8 个引物共产生 89 条谱带, 其中 55 条具有多态性, 多态性比率为 61.8%, 获得多态性谱带数最多的引物是 U807 和 U482, 均为 9 条, 多态性带最少的是 U834, 为 5 条, 谱带大小在 0.1~2.0 kb, 其中 U836、U811 引物扩增后的电泳结果见图 1、2。

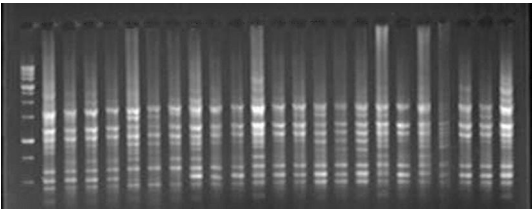


图 1 引物 U836 的扩增结果

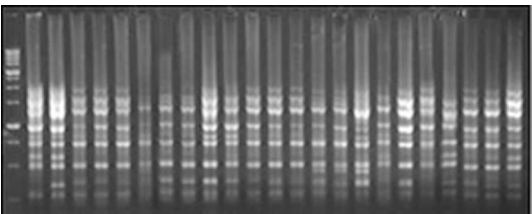


图 2 引物 U811 的扩增结果

2.2 遗传相似系数和聚类分析

以 39 个莲藕品种和 89 个位点的谱带数据为原始矩阵, 用 NTSYS2pc Version 2.10 计算, 获得了 741 个两两不同的品种间遗传相似性系数。结果表明, 39 份莲藕品种的遗传相似系数 GS 介于 0.63~0.98 之间, 平均相似性系数为 0.83。其中遗传相似系数最大的是“白泡”和“鸾凤玉”, 以及“武植二号”和“红楼”, 均达到 0.98, 说明它们之间的亲缘关系很近, 遗传差异很小。

而“飞虹”和“长节六月报”间的遗传相似系数最小, 为 0.63。利用 ISSR 标记数据计算的材料间的遗传相似性系数矩阵, 采用 UPGMA 法构建了 39 份莲藕样品间的遗传关系聚类图 (图 3), 以 0.788 为阈值可以把 39 个品种分为 4 组, 第一组聚有“白泡”等 34 个品种, GS 为 0.63~0.98, 遗传资源比较丰富, 既有食用品质优良的“泡子”、“武植二号”、“青毛节”等藕莲品种, 还包括“红千叶”、“干瓣莲”、“绍兴红莲”等观赏价值大的花莲; 第二组和第三组各聚有 2 个品种, 分别是“长节六月报”、“太真出洛”和“青毛节”、“西施”; “飞虹”则单独自成一组。而以经济用途为培育目的, 经过长期的人工选择而分为的花莲、籽莲和藕莲并没有明显趋向各自聚为一类, 这可能与莲属植物种间亲缘关系十分密切相关, 绝大多数遗传特性仍存在较大的相似性。

表 2 ISSR 分析所用的引物序列与扩增结果

编号	引物序列	条带总数	多态条数	多态百分比/%
U807	(AG) <sub>8</sub> T	13	9	69.2
U811	(GA) <sub>8</sub> C	12	8	66.7
U834	(AG) <sub>8</sub> YT	11	5	45.5
U836	(AG) <sub>8</sub> YT	14	6	42.9
U840	(GA) <sub>8</sub> YT	11	6	54.5
U841	(GA) <sub>8</sub> YC	10	6	60.0
U842	(GA) <sub>8</sub> YG	11	9	81.8
U844	(CT) <sub>8</sub> RC	7	6	85.7
Total		89	55	61.8

3 结论与讨论

品种间遗传关系研究和遗传多样性分析对于作物育种具有十分重要的意义<sup>[9]</sup>。传统分类常常采用形态标记进行, 形态特征受环境影响较大, 鉴定比较困难, 存在的误差大, 而 DNA 分子标记反映的是遗传本质上的差异<sup>[10]</sup>。ISSR 分子标记由于具有扩增产物稳定、多态性高等优点, 常被作为种间及种下物种鉴定与亲缘关系分析的工具<sup>[11]</sup>。Huang 等<sup>[12]</sup>用 ISSR 分析了番薯属的亲缘关系, 获得了丰富的多态性条带; 马朝芝等<sup>[13]</sup>在用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性时, 用 20 条引物扩增出了 125 条多态性带, 可把中国半冬性、瑞典冬性和瑞典春性油菜 24 份材料明显区分为 3 类。试验用筛选的 8 条 ISSR 引物在 39 个莲藕样品中扩增出了 37 条多态性条带, 平均为 6.9 条, 其中引物 U807 和 U482 都得到了 9 条多态性条带。表明 ISSR 技术可以检测到丰富的遗传多态性, 能够对样品进行有效的区分, 可为莲藕的种质资源的研究利用提供理论参考。

用 NTSYS2pc Version 2.10 计算的供试莲藕的遗传相似系数都大于 0.60, 69.6% 的相似系数值在 0.80 以上, 其中“白泡”和“鸾凤玉”, “红楼”和“武植二号”相似系数最近, 均为 0.98, 表明莲藕品种间的遗传相似程度很高, 这与其它研究报道的结果相似<sup>[3, 14]</sup>, 主要与莲藕靠地下茎繁殖, 以及在长期育种过程中种质资源交流和种质混杂相关。来自孝感市的 3 个品种之间的遗传相似系数也非常高, “白泡”和“三五”的遗传相似系

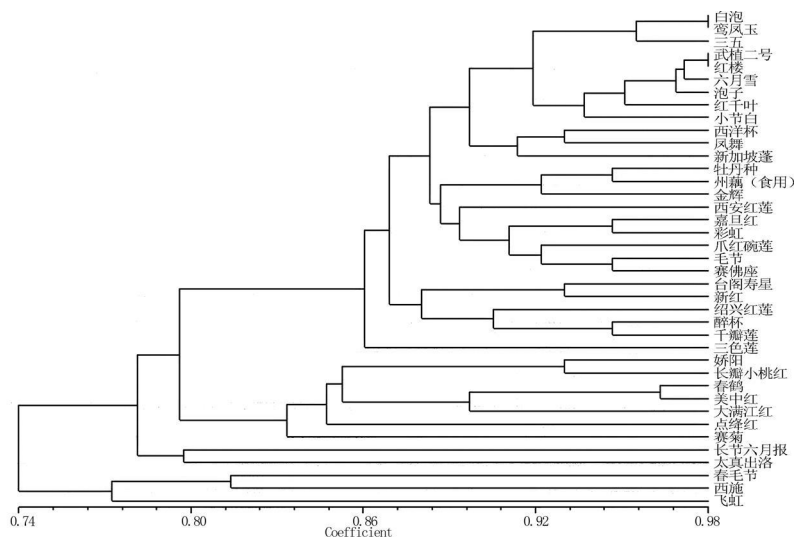


图3 39份莲藕样品的UPGMA聚类结果

数为0.97,“武植二号”与“三五”和“白泡”的遗传相似系数为0.92,遗传多样性很低,这与它们可能从相近的祖先分离出来以及与孝感的莲藕多为从武汉引种栽培有关。同时,部分莲藕的遗传相似系数相对较大,如“飞虹”和“长节六月报”间的遗传相似系数为0.63,在自然条件下能以昆虫为媒介进行异花授粉或在育种过程中进行人工授粉,且相对其它同属植物而言莲藕杂种的发芽成苗率要高的多,因此造成莲藕品种间遗传资源的混合和品种内存在一定的变异,这为莲藕的杂交育种提供了较好的遗传背景<sup>[14-15]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院武汉植物研究所. 中国莲[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1-3, 53-61.
- [2] 赵有为. 中国水生蔬菜[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 18-19.
- [3] 韩延闯, 刁英, 周立, 等. 莲藕品种DNA指纹图谱的绘制[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(3): 193-196.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [5] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs[J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42: 741-750.
- [6] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生

稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 4(7): 741-750.

- [7] 白占兵, 粟建光, 陈基权, 等. 利用 ISSR 标记分析青麻种质资源遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3532-3541.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
- [9] Schut J W, Qi X, Stam P. Association between relationship measurement based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 1161-1168.
- [10] 苏永涛, 刘杨, 庄天明, 等. 栽培番茄品种指纹图谱的 AFLP 分析[J]. 中国蔬菜, 2010, 18(3): 34-39.
- [11] 王骞, 郭志刚, 赵桂仿. 利用 ISSR 分析 6 种绞股蓝属植物的遗传多样性与亲缘关系[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2008, 38(5): 767-770.
- [12] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Japomoea series Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by ISSR and restriction analysis of chloroplast DNA[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1050-1060.
- [13] 马朝芝, 傅廷栋, Stine Tuevesson, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
- [14] 瞿桢, 魏英辉, 李大威, 等. 莲品种资源的 SRAP 遗传多样性分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 21-25.
- [15] 全志武, 汪静, 潘磊, 等. 10 个藕莲品种 SSR 指纹图谱的构建与品种鉴别[J]. 中国蔬菜, 2008(3): 15-17.

## Analysis of Genetic Diversity of 39 Lotus Root Cultivars by Using ISSR Markers

LI Chang-chun, DAI Yu-jun, SU Chao, LI Jian-hua, TIAN Chun-yuan, YAO Guo-xin  
(College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000)

**Abstract:** ISSR were used to detect the genetic diversity among 39 lotus root cultivars and 89 bands were amplified with 8 primers, including 55 polymorphic bands. The polymorphic percentage was 61.8%. And all the 39 lotus root cultivars could be distinguished by genetic similarity coefficient and cluster analysis. The result showed that ISSR approach was efficient to reveal the genetic relationship of lotus root on molecular level, which could provide reference for research in lotus root emplantment.

**Key words:** lotus root; polymorphism; ISSR