

刘子金,杨小波,林泽钦,等. 10种藤黄科植物遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):55-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.015

10种藤黄科植物遗传多样性的 ISSR 分析

刘子金^{1,2}, 杨小波^{1,2}, 林泽钦^{1,2}, 吴庭天^{1,2}, 周 韬^{1,2}, 李东海^{1,2}, 岑举人^{1,2}

(1. 海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南海口 570228; 2. 海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

摘要:运用内部简单重复序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记对采自海南省的10种藤黄科植物进行遗传多样性分析,结果显示:(1)从100条ISSR引物中筛选出8条能扩增出清晰条带且多态性明显的引物;8条引物扩增出331条条带,其中多态性位点有106个,多态性比例为100%,平均每条引物扩增位点数为13.25个。(2)材料间的遗传相似系数范围为0.4078~0.6990,平均为0.5622。以0.6200作为最低遗传相似系数,将10种藤黄科植物划分为5大类:①铁力木;②菲岛福木、单花山竹子、山竹子;③多花山竹子、越南黄牛木、黄牛木;④岭南山竹子;⑤红厚壳、薄叶红厚壳。研究结果首次从分子水平揭示了藤黄科植物的遗传多样性,为合理地引种、驯化、保护、利用藤黄科植物野生资源提供了重要的参考依据和数据支持。

关键词:藤黄科;ISSR;遗传多样性;聚类分析;相似系数

中图分类号: S567.1^{*}90.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0055-04

藤黄科(Guttiferae)属双子叶植物纲五桠果亚纲,是一个热带科。我国有8属87种藤黄科植物,分别隶属于3亚科,几乎遍布全国各地^[1],海南省主要有黄牛木属、红厚壳属、铁力木属、藤黄属等。近年来,随着人们对藤黄科植物研究的不断深入,从中分离出大量黄酮类化合物^[2]、咕吨酮类化合物^[3-4]、萜类化合物^[5]等。药理研究表明:藤黄科植物药用活性成分具有抗肿瘤^[6]、抗艾滋病^[7]、抗菌^[8]等多种生物活性,

极具研究和开发价值。因此,对藤黄科植物进行深入研究具有重要意义。

内部简单重复序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)是由Zietkiewicz等在1994年提出的一种新型分子标记技术^[9],用于检测简单重复序列(SSR)间的DNA序列差异,具有比随机扩增多态DNA(RAPD)更高的可重复性、稳定性^[10]。同时,该试验操作简单、快速、高效,不需要繁琐的构建文库、设计引物、杂交、同位素显示等步骤,而且ISSR标记可以揭示整个基因组的一些特征,并呈孟德尔式遗传。目前,ISSR技术已在品种鉴定^[11]、遗传作图^[12-13]、遗传多样性^[14-15]等研究中得到了广泛应用^[16]。本研究利用ISSR技术对采自海南省的10种藤黄科植物进行亲缘关系、遗传多样性分析,以期对藤黄科植物种质资源的收集、鉴定、保护和利用提供理论基础。

收稿日期:2015-06-16

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20153155);海南大学博士科研启动基金(编号:kyqd1420)。

作者简介:刘子金(1991—),男,河南新乡人,硕士研究生,主要从事热带药用植物资源及其活性物质研究。E-mail:1097717416@qq.com。

通信作者:岑举人,博士,讲师,主要从事热带药用植物资源及其活性物质研究。E-mail:240729735@qq.com。

[11] Tsaftaris A, Pasentsis K, Makris A, et al. The study of the E-class SEPALLATA3-like MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(14): 1675-1684.

[12] 郭爽,沈火林,杨文才,等. 利用抑制消减杂交技术分离辣椒细胞质雄性不育育性恢复相关EST[J]. *园艺学报*, 2009, 36(10): 1443-1449.

[13] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 464-489.

[14] Kim S H, Mizuno K, Fujimura T. Isolation of MADS-box genes from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) expressed specifically in vegetative tissues[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2002, 43(3): 314-322.

[15] Li H L, Wang Y, Guo D, et al. Three MADS-box genes of *Hevea brasiliensis* expressed during somatic embryogenesis and in the laticifer

cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(6): 4045-4052.

[16] Mathew R, Rosenthal A, Fellows K, et al. MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 242.

[17] Zhang B, Su X, Zhou X. A MADS-box gene of *Populus deltoides* expressed during flower development and in vegetative organs[J]. *Tree Physiology*, 2008, 28(6): 929-934.

[18] Whipple C J, Ciceri P, Padilla C M, et al. Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2004, 131(24): 6083-6091.

[19] Aoki S, Uehara K, Imafuku M, et al. Phylogeny and divergence of basal angiosperms inferred from APETALA3- and PISTILLATA-like MADS-box genes[J]. *Journal of Plant Research*, 2004, 117(3): 229-244.

[20] 刘菊华,徐碧玉,张静,等. MADS-box转录因子的相互作用及对果实发育和成熟的调控[J]. *遗传*, 2010, 32(9): 893-902.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料分别为红厚壳、薄叶红厚壳、山竹子、岭南山竹子、单花山竹子、多花山竹子、菲岛福木、黄牛木、越南黄牛木和铁力木,所有物种均由海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室主任杨小波教授鉴定。采集地信息见表1。

表1 材料来源信息

序号	种名	采集地	代号
1	红厚壳(<i>Calophyllum inophyllum</i> L.)	海口市演丰镇	H
2	薄叶红厚壳(<i>Calophyllum membranaceum</i>)	陵水市吊罗山	B
3	山竹子(<i>Garcinia mangostana</i> L.)	五指山市毛道乡	S
4	岭南山竹子(<i>Garcinia oblongifolia</i>)	陵水市吊罗山	L
5	单花山竹子(<i>Garcinia oligantha</i>)	陵水市吊罗山	d
6	多花山竹子(<i>Garcinia Multiflora</i>)	陵水市吊罗山	D
7	菲岛福木(<i>Garcinia subelliptica</i>)	海口市美兰区	F
8	黄牛木(<i>Cratoxylum Cochinchinense</i>)	昌江市霸王岭	N
9	越南黄牛木(<i>Cratoxylum formosum</i>)	昌江市霸王岭	Y
10	铁力木(<i>Mesua ferrea</i> L.)	儋州市植物园	T

ISSR-PCR 扩增反应引物根据 British Columbia 大学公布的 ISSR 引物序列,由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成;Taq DNA 聚合酶、2 × Taq PCR Master Mix、2 kb DNA marker 均购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。

1.2 试验仪器

主要仪器有:HH-2 数显恒温水浴锅;Eppendorf Centrifuge 5 415R 冷冻离心机;Biometra TGradient PCR 仪;DYY-11 型电泳仪,北京市六一仪器厂;BG-SubMINI 水平电泳槽;Alphalmager-2200 凝胶成像系统。

1.3 试验方法

1.3.1 总 DNA 的提取 采用购自成都福际生物技术有限公司的植物 DNA 提取试剂盒提取基因组总 DNA,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性、浓度,将其稀释为 20 ng/L,用于 ISSR 分子标记技术分析,置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 扩增与成像 ISSR-PCR 反应体系(20 μL):10 μL 2 × Taq PCR Master Mix,1 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL),1 μL 模板,用灭菌蒸馏水补足至 20 μL。扩增程序:94 °C 5 min,45 °C 1 min,72 °C 90 s;94 °C 50 s,43 °C 50 s,72 °C 1 min,40 个循环;72 °C 10 min。于 4 °C 贮存。PCR 扩增在 Biometra T-Gradient PCR 仪上完成。ISSR 扩增产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 2 kb Ladder Plus Marker 为相对分子质量标记,在紫外凝胶成像系统下拍照记录。

1.3.3 数据处理 对 ISSR-PCR 扩增产物进行条带数目统计,采取 0/1 赋值记带,扩增产物相同迁移位置上有条带记为“1”,无条带记为“0”,得到 0/1 数据矩阵,然后将数据导入 NTsys 2.10e 软件进行聚类分析。首先用 SimQual 程序计算 Nei-Li 相似系数,再用 SHAN 程序中的非加权成组算术平均数法(unweighted pair-group method, arithmetic average, UPGMA)进行聚类分析,最后用 TREEPLOT 过程构建树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,由图 1 可知,所得条带均匀清晰,无蛋白质、RNA 污染,无拖尾现象,纯度高,完全满足 ISSR 分析的要求。

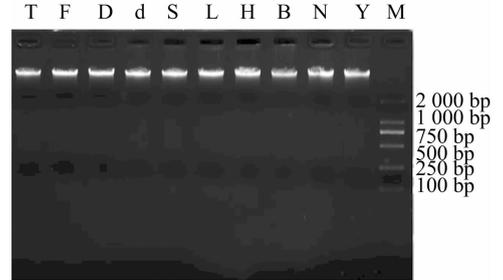


图1 10个藤黄科植物样品的总DNA电泳检测图谱

2.2 ISSR 扩增结果

用红厚壳、山竹子 DNA 为模版,对 100 条 ISSR 引物进行筛选,最终确定 8 条带型清晰、多态性较好的引物用于藤黄科植物的多态性分析。表 2 结果表明:8 条引物扩增出 331 条清晰可辨的条带,DNA 片段多集中在 750 ~ 2 000 bp 之间,平均每个引物扩增出 41.38 条条带,其中位点有 106 个,平均每条引物扩增位点数为 13.25 个,均呈现多态性,多态性比例达到了 100%,说明 10 种藤黄科植物在 DNA 分子水平上存在着丰富的遗传多样性。引物 ISSR 扩增图谱见图 2。

表2 引物序列和扩增结果

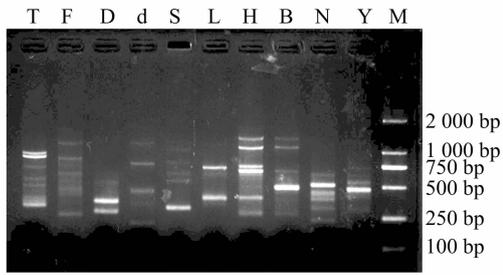
引物	引物序列 (5'→3')	扩增条带数(条)	多态性条带数(条)	退火温度(°C)	多态性位点比例(%)
UBC10	(GA) ₈ T	51	51	48	100
UBC811	(GA) ₈ C	43	43	48	100
UBC815	(CT) ₈ G	30	30	48	100
UBC822	(TC) ₈ A	33	33	48	100
UBC826	(AC) ₈ C	42	42	48	100
UBC842	(GA) ₈ YG	33	33	55	100
UBC843	(CT) ₈ RA	45	45	55	100
UBC844	(CT) ₈ RC	54	54	55	100

2.3 材料间亲缘关系的聚类分析

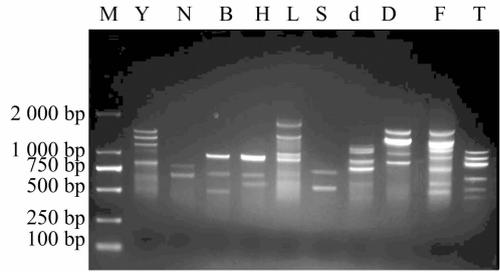
由表 3 可知,10 种藤黄科植物的遗传相似系数在 0.407 8 ~ 0.699 0 之间,平均遗传相似系数为 0.562 2。其中薄叶红厚壳和单花山竹子的遗传相似系数最小,为 0.407 8,亲缘关系最远;薄叶红厚壳和红厚壳相似系数最大,为 0.699 0,亲缘关系最近。通过聚类分析,以阈值 0.620 0 为基准,可以将 10 种藤黄科植物明显地划分为 5 个类群,如图 3 所示:第 1 类为铁力木;第 2 类为菲岛福木、单花山竹子、山竹子;第 3 类为多花山竹子、越南黄牛木、黄牛木;第 4 类为岭南山竹子;第 5 类为红厚壳、薄叶红厚壳。

3 讨论

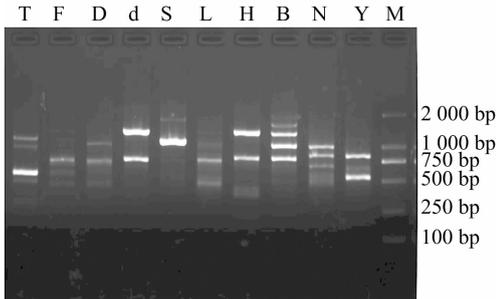
藤黄科植物由于其重要的经济价值、食用价值、药用价值,已经成为世界各国植物资源研究的热点之一,尤其是在化



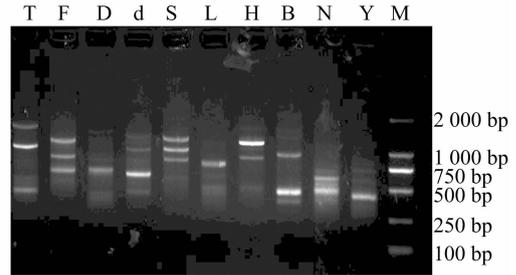
a. 引物810扩增结果



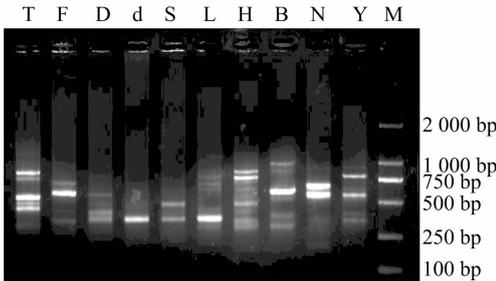
b. 引物811扩增结果



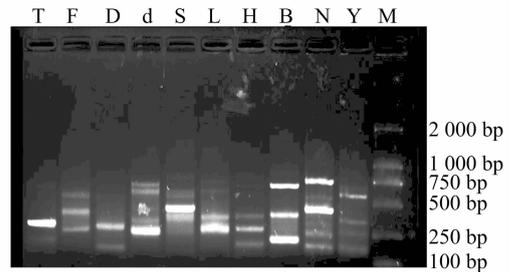
c. 引物815扩增结果



d. 引物822扩增结果



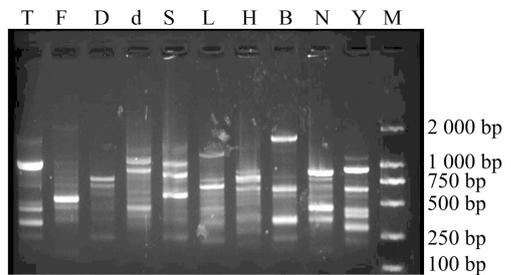
e. 引物826扩增结果



f. 引物842扩增结果



g. 引物843扩增结果



h. 引物844扩增结果

图2 引物ISSR扩增结果

表3 供试材料的遗传相似系数

材料代号	T	F	D	d	S	L	H	B	N	Y
T	1.000 0									
F	0.504 9	1.000 0								
D	0.582 5	0.611 7	1.000 0							
d	0.572 8	0.621 4	0.621 4	1.000 0						
S	0.572 8	0.582 5	0.640 8	0.631 1	1.000 0					
L	0.572 8	0.601 9	0.582 5	0.553 4	0.553 4	1.000 0				
H	0.592 2	0.582 5	0.601 9	0.514 6	0.592 2	0.611 7	1.000 0			
B	0.543 7	0.456 3	0.534 0	0.407 8	0.543 7	0.563 1	0.699 0	1.000 0		
N	0.504 9	0.495 1	0.611 7	0.524 3	0.582 5	0.504 9	0.563 1	0.592 2	1.000 0	
Y	0.563 1	0.514 6	0.669 9	0.524 3	0.524 3	0.466 0	0.485 4	0.475 7	0.650 5	1.000 0

学成分、药理药效方面,近年来人们开展了较为全面的研究,并取得了丰富的成果。因此,对藤黄科植物资源进行较为统

一、完善、准确的分类,对资源的收集、鉴定及合理利用具有非常重要的意义。本研究采用分子标记的方法,从分子的角度

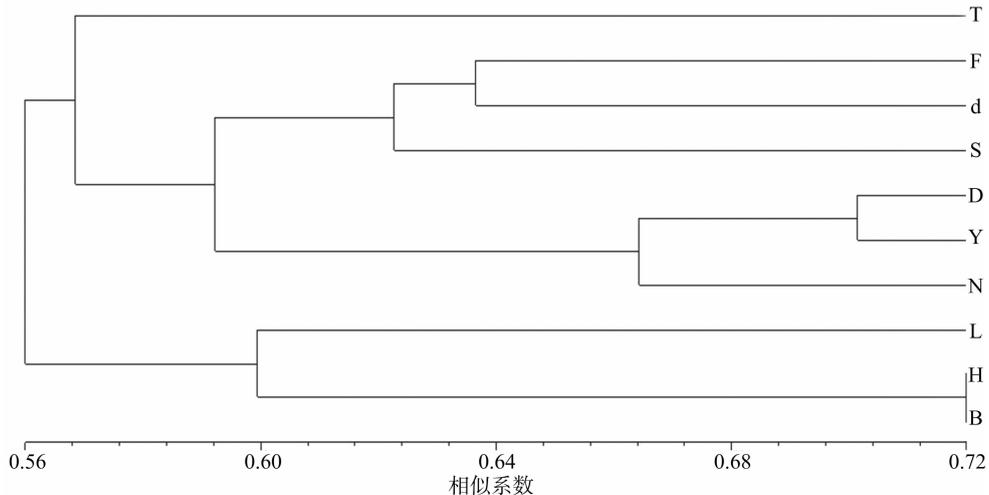


图3 基于Nei & Li遗传相似系数的 ISSR 聚类分析结果

去研究植物,更能够发掘物种内部的变异因素,从而更加准确地获知物种之间的亲缘关系、遗传多样性。因此,本研究通过所选取的8条引物获得了331条条带,106个多态位点,充分说明所选引物具有信号强、特异性高、覆盖度广等特点,也能够充分地揭示藤黄科不同植物间的亲缘关系和存在的遗传差异(充分揭示藤黄科植物具有遗传多样性)。研究表明:10种植物聚为5类,其中铁力木聚为1类,红厚壳、薄叶红厚壳聚为1类,这与它们的传统分类地位是一致的^[1]。藤黄属中的5种植物山竹子、岭南山竹子、单花山竹子、多花山竹子、菲岛福木分别聚为3类。其中,岭南山竹子单独聚为1类,菲岛福木、山竹子、单花山竹子聚为1类,而多花山竹子却与黄牛木属中的黄牛木、越南黄牛木聚在一起。这可能与它们的生境有关,多花山竹子、黄牛木属植物生境相同,均分布在次生林或者灌丛中,地理分布存在一定的重叠。

ISSR分子标记具有信息量丰富、操作简单、重复性好、稳定性强等诸多优点,因而被广泛应用于植物遗传多样性研究中^[17-18]。本研究表明,藤黄科植物之间具有丰富的遗传多样性,这意味着它们具有较高的适应能力、较大的育种和改良能力。如今,藤黄科植物在人们生活中起到的影响也越来越大,广泛用作食用水果、木材和各种其他天然产品的来源,也是化工、医药的重要原料。因此,准确了解植物间的亲缘关系,能够为繁育出更优质的果树、实用木材以及获得含有更高含量药物活性成分的品种提供理论依据,从而研发新的技术,从根本上解决用于现代制药行业所需的植物原料缺乏问题,有效地避免对藤黄科野生植物资源的过度采挖造成某些物种的濒危或灭绝,最终达到对植物资源合理有效开发利用目的。

参考文献:

- [1]中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1990:111-112.
- [2]Kumar S, Sharma S, Chattopadhyay S K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance [J]. *Fitoterapia*, 2013, 89:86-125.
- [3]Deng Y X, Guo T, Shao Z Y, et al. Three new xanthenes from the res-

- in *Garcinia hanburyi* [J]. *Planta Medica*, 2013, 79(9):792-796.
- [4]Niu S L, Li Z L, Ji F, et al. Xanthenes from the stem bark of *Garcinia bracteata* with growth inhibitory effects against HL-60 cells [J]. *Phytochemistry*, 2012, 77:280-286.
- [5]张俊艳, 韩英梅, 常允平. 藤黄属植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(3):297-303.
- [6]Zhang X, Li X, Sun H, et al. *Garcinia* xanthenes as orally active anti-tumor agents [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(1):276-292.
- [7]Reutrakul V, Anantachoke N, Pohmakotr M, et al. Anti-HIV-1 and anti-inflammatory lupanes from the leaves, twigs, and resin of *Garcinia hanburyi* [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(4):368-371.
- [8]Arunrattiyakorn P, Suksamram S, Suwannasai N, et al. Microbial metabolism of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8):730-734.
- [9]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2):176-183.
- [10]罗海燕, 陈业渊. ISSR分子标记及其应用[J]. *安徽农学通报*, 2008, 14(19):45-46, 27.
- [11]徐君, 刘凤军, 张国芹, 等. 香稻不育系ISSR正交体系优化及验证[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(4):21-24.
- [12]战晴晴, 隋春, 魏建和, 等. 利用ISSR和SSR分子标记构建北柴胡遗传图谱[J]. *药学学报*, 2010(4):517-523.
- [13]李伦, 熊永兴, 赵玉霞, 等. 麻城福白菊的ISSR遗传图谱的构建[J]. *中国药师*, 2014(12):2059-2062, 2063.
- [14]卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的ISSR遗传多样性分析[J]. *中草药*, 2013, 44(1):96-100.
- [15]王岚, 朱熠鹏, 蒋明, 等. 青花菜种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. *浙江农业学报*, 2014, 26(4):915-919.
- [16]朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. *种子*, 2010, 29(2):55-59.
- [17]刘娟, 廖康, 那斯尔曼苏尔, 等. 利用ISSR分子标记构建新疆杏种质资源核心种质[J]. *果树学报*, 2015(3):374-384.
- [18]李志勇, 李鸿雁, 蔡丽艳, 等. 中国扁蓿豆种质资源遗传多样性的ISSR标记与生态因子相关性分析[J]. *华北农学报*, 2014(6):94-100.