

地锦属野生种及栽培品种的 ISSR 分析鉴定

张肖娟¹ 孙振元²

(1 中国农业大学观赏园艺与园林系 2 中国林业科学研究院林业研究所)

摘要: 利用 ISSR 分子标记对 9 份地锦属植物材料进行基因组多态性分析, 7 条引物共扩增出 74 条带, 其中多态带百分率达 95.9%, 所选引物能将全部供试材料区分开, 并表现出很高的鉴定效率。利用 NTSYSpc2.10e 软件进行相似系数分析, 9 份地锦属植物材料的遗传相似系数在 0.30~0.89 之间, 平均相似系数为 0.517。通过扩增结果的 UPGMA 聚类, 引入品种五叶地锦‘加引 1 号’与 8 个国内种质分开; 8 个国内种质又聚为 5 小叶型和非 5 小叶型两大类, 与形态学的分类结果基本一致。研究表明, ISSR 在地锦属种质资源分类和鉴定上具有一定的准确性, 可以作为品种鉴定和新品种 DUS 测试的辅助工具。

关键词: 地锦属植物; ISSR; 亲缘关系; 品种鉴定

中图分类号: S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)06-0177-04

ZHANG Xiao-juan¹; SUN Zhen-yuan². **ISSR analysis of *Parthenocissus* spp. and cultivars.** *Journal of Beijing Forestry University* (2011) **33**(6) 177-180 [Ch, 14 ref.]

1 Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, 100193, P. R. China;

2 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, P. R. China.

Nine germplasms of *Parthenocissus* were analyzed for their genome polymorphism by ISSR. A total of 74 bands were amplified by 7 primers, of which 95.9% were polymorphic. All materials could be distinguished by the selected primers with high identification efficiency. The genetic similarity coefficients of the 9 germplasms varied among germplasms was 0.30 to 0.89 with an average of 0.517, computed with software NTSYSpc2.10e. Judging from the clustering dendrogram constructed by UPGMA method, an introduced cultivar *P. quinquefolia* ‘Jiayin 1’ was separated from 8 domestic species. The clustering dendrogram was constructed by UPGMA method. *P. quinquefolia* ‘Jiayin 1’ was separated from 8 domestic germplasms, and then 8 domestic germplasms were divided into two major groups with different leaf types. The domestic germplasms were further classified into two groups as also signified by their different leaf morphologies. In conclusion, ISSR analysis could be used for germplasm classification, variety identification and DUS testing in *Parthenocissus* spp. with reliable accuracy.

Key words *Parthenocissus*; ISSR; genetic relationship; variety identification

地锦属(*Parthenocissus*, 也称爬山虎属)植物, 为葡萄科(Vitaceae)落叶木质藤本, 约有 13 个种, 分布于亚洲和北美, 其中 9 个种原产我国^[1]。该属植物具有很强的固着、攀援能力和优良的耐旱、耐寒特性, 是城市垂直绿化、水土保持、植被恢复、荒山绿化的重要植物资源。

近年来, 国外已经育出了地锦属植物新品种 22 个, 分属地锦(*P. tricuspidata*)、五叶地锦(*P.*

quinquefolia)、三叶地锦(*P. semicordata*) 3 个种^[2]。2001 年以来, 我国开展了地锦属植物种质资源的搜集工作, 基本搜集到了所有国内野生种; 付彦荣^[3]、李正红^[4]研究了地锦和五叶地锦的种间杂交技术, 为获得综合二者优点的新类型奠定了基础; 利用辐射诱变和化学诱变手段, 获得了一批在株型、叶形、叶色等形态特征上的新变异类型或无性系。作者所在课题组通过引种驯化, 选育出五叶地锦‘加引 1

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: 国家林业行业标准项目(2009-LY-003)、“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD01A19-5)。

第一作者: 张肖娟。主要研究方向: 园林植物生理生态。电话: 010-62815086 Email: sword0775@sina.com 地址: 100193 北京市圆明园西路 2 号中国农业大学西校区 S281 信箱。

责任作者: 孙振元, 博士, 研究员。主要研究方向: 园林植物生理生态。电话: 010-62889626 Email: sunzy@263.net 地址: 100091 北京市颐和园后中国林业科学研究院林业楼 201 室。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

号’、花叶地锦‘锦带’和绿叶地锦‘翠玉’3个地锦属植物新品种;在种质资源搜集和品种选育的基础上,开展了地锦属植物新品种特异性、一致性、稳定性(DUS)测试指南的编制工作。

ISSR(inter-simple sequence repeat)是一种近年来应用较为广泛的分子标记技术,其基本原理是在SSR(simple sequence repeat)的3’或5’端锚定1~4个碱基作引物,对两侧具有反向排列SSR的一段序列进行扩增,而不是扩增SSR本身。该标记技术克服了SSR、AFLP、RFLP和RAPD的技术性限制,具有操作简单、可重复性高、模板DNA用量少等优点,已在遗传多样性及亲缘关系分析、品种鉴定等方面研究中得到了广泛应用^[5]。沈永宝等^[6]用5条ISSR引物成功构建银杏(*Ginkgo biloba*)13个主栽品种的指纹图谱用以品种鉴别。缪恒彬等^[7]选用21个ISSR引物对新选育的25个小菊(*Chrysanthemum morifolium*)品种进行扩增并建立了其ISSR指纹图谱,其中一条引物ISSR35可将25个品种完全区分开。在与地锦属同科的葡萄属

(*Vitis*)的相关研究上,Herrera等^[8]应用ISSR和RAPD2种分子标记方法分析了4种在智利广泛种植的欧亚种葡萄的遗传多样性,表明ISSR标记的效果要好于RAPD标记;Moreno等^[9]成功地用6个ISSR引物鉴定出了11个通过形态和RAPD技术难以区分的葡萄品种。目前在地锦属种质资源鉴定中尚无分子标记应用的报道。

本研究通过ISSR分子标记技术对地锦属的9个栽培品种及野生种进行分析,从分子水平阐明其遗传多样性和亲缘关系,以期将ISSR作为地锦属植物品种鉴定和新品种DUS测试的有效手段,为地锦属植物育种工作的进一步开展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试地锦属植物材料(表1),种植于中国林业科学研究院玉泉山实验地。于2010年9月分别采取每个栽培品种或野生种5~8枚幼叶,置于保鲜袋中,封口,液氮速冻后-70℃超低温冰箱保存。

表1 供试地锦属植物材料信息

Tab.1 Information of tested *Parthenocissus* accessions

序号	中文名称	拉丁学名	形态特征	来源
1	地锦	<i>P. tricuspidata</i>	两型叶,单叶为主,仅基部着生3小叶复叶,卷须嫩时顶端膨大成圆珠型	北京
2	五叶地锦‘加引1号’	<i>P. quinquefolia</i> ‘Jiayin 1’	5小叶复叶,卷须嫩时顶端尖细卷曲成钩状	加拿大
3	花叶地锦‘锦带’	<i>P. henryana</i> ‘Jindai’	5小叶复叶,卷须嫩时顶端卷曲成钩状,叶面有白色斑纹	河南伏牛山
4	花叶地锦	<i>P. henryana</i>	5小叶复叶,卷须嫩时顶端卷曲成钩状	贵州独山县
5	绿叶地锦‘翠玉’	<i>P. laetevirens</i> ‘Cuiyu’	5小叶复叶,卷须嫩时顶端卷曲成钩状	安徽霍山
6	绿叶地锦	<i>P. laetevirens</i>	5小叶复叶,卷须嫩时顶端卷曲成钩状	贵州独山县
7	异叶地锦	<i>P. dalzielii</i>	两型叶,短枝上着生3小叶复叶,长枝上着生单叶,卷须嫩时顶端微膨大成圆珠型	贵州贵定县
8	三叶地锦	<i>P. semicordata</i>	3小叶复叶,卷须嫩时顶端微膨大成圆珠型	贵州独山县
9	栓翅地锦	<i>P. suberosa</i>	单叶,卷须嫩时顶端膨大成圆珠型	贵州独山县

1.2 基因组DNA提取

采用改良的CTAB法,参照逄卫国^[10]、夏惠^[11]提取葡萄DNA的方法。称取0.5g幼叶置于研钵中,加液氮研磨成粉末,迅速转移至2个1.5mL离心管中(每管约0.25g);加入600μL CTAB缓冲液(含2%PVP)、20mLβ-巯基乙醇混匀,65℃水浴60min,其间轻轻倒置2~3次;加入等体积氯仿-异戊醇(体积比24:1)混匀,12000r/min离心10min,取上清用氯仿-异戊醇重复抽提一次、离心;取上清,加入4/5体积异丙醇(约400μL)混匀,-20℃下沉淀10min;挑出沉淀,用70%乙醇洗一次,真空干燥;加入500μL TE溶解DNA,加RNase至终浓度为20μg/mL,37℃保温30min;加入二倍体积冷却的无水乙醇和1/10体积3mol/L NaAc,-20℃充分沉淀;挑出沉淀,用70%乙醇洗2次,真空干

燥;用50~100μL TE溶解DNA。

用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,用Thermo公司的NANODROP2000微量紫外分光光度计检测DNA溶液的纯度与浓度,并将浓度稀释至20ng/μL。

1.3 DNA扩增和电泳

实验采用25μL反应体系,其中含2.5μL 10×PCR buffer(含Mg²⁺)、0.5μL dNTPs(0.2mmol/L),0.5μL Taq DNA聚合酶,2μL模板DNA(40ng),0.5μmol/L引物。引物来源于加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的ISSR引物序列。用于ISSR-PCR反应的引物、dNTP、Taq酶、DNA Marker(DGL2000)均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

PCR反应程序为:95℃预变性5min,95℃变性30s,50~52℃退火45s,72℃延伸2min,进行

45 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,于 4 ℃ 保存。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,凝胶成像系统成像。

1.4 数据分析

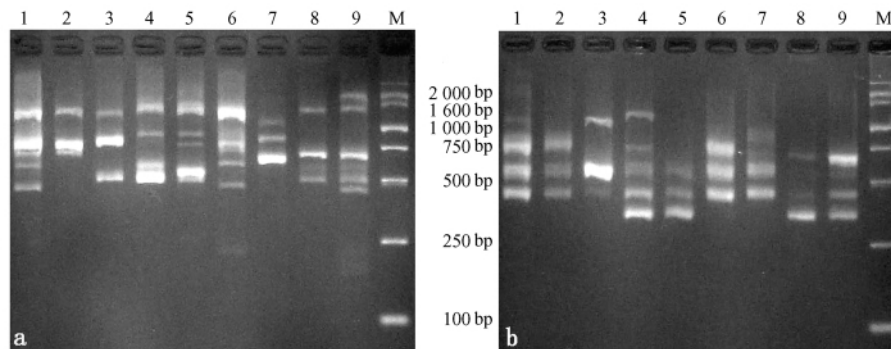
按照电泳图谱同一位置上 ISSR 条带的有无进行统计,有条带的记为 1,无条带的记为 0。利用 NTSYSpc 2.10e 软件进行相似系数分析,并通过 UPGMA 方法进行聚类分析,建立亲缘关系树形图。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

由 1、2、7、9 号材料对 50 条引物进行筛选,从中

选出 7 条重复性好、扩增条带清晰、多态性高的引物用于地锦属植物材料的 ISSR 扩增(图 1、表 2)。7 条引物共扩增出 74 条带,其中多态性条带 71 条,多态带百分率为 95.9%。单条引物平均扩增出条带 10.6 条。扩增产物长度在 100 ~ 2 500 bp 之间,多集中在 300 ~ 2 000 bp。扩增出条带最多的是引物 825,达 17 条,扩增出条带最少的是引物 866 和 824,有 6 条。除引物 866、814、825 的多态带百分率分别为 83.3%、90.0% 和 94.1% 外,其余引物的多态带百分率都达 100%。可见,用 ISSR 方法检测地锦属遗传多样性的效率很高,也表明地锦属的遗传多样性极为丰富。



a. 引物 813 的 ISSR 扩增; b. 引物 814 的 ISSR 扩增;

1 ~ 9. 对应表 1 中的 9 份地锦属植物材料; M. DNA Marker(DGL 2000)

图 1 9 份地锦属植物材料的 ISSR 扩增

Fig. 1 ISSR-PCR amplification patterns of 9 *Parthenocissus* germplasms

表 2 ISSR 引物的碱基序列及扩增结果

Tab. 2 Sequence and amplification results of ISSR primers

引物	碱基序列	扩增带数	多态性带数	多态带百分率/%
813	(CT) ₈ T	10	10	100
814	(CT) ₈ A	10	9	90.0
815	(CT) ₈ G	13	13	100
824	(TC) ₈ G	6	6	100
825	(AC) ₈ T	17	16	94.1
829	(TG) ₈ C	12	12	100
866	(CTC) ₆	6	5	83.3

2.2 聚类分析

9 份地锦属植物材料的遗传相似系数在 0.30 ~ 0.89 之间,平均相似系数为 0.517。其中,异叶地锦与栓翅地锦的相似系数最大(0.888 9),五叶地锦‘加引 1 号’和绿叶地锦(贵州野生种)的相似系数最小(0.301 9)。

从图 2 中可以看出,在遗传相似系数为 0.43 处,五叶地锦‘加引 1 号’与其余的 8 份材料分离开来。除五叶地锦‘加引 1 号’外的 8 份地锦属植物材料,在遗传相似系数为 0.46 处,可明显分为 2 大类群。一类包括花叶地锦‘锦带’、花叶地锦(贵州野生种)、绿叶地锦‘翠玉’、绿叶地锦(贵州野生

种)。其中,绿叶地锦‘翠玉’与绿叶地锦(贵州野生种)的相似系数最大(0.842 1),花叶地锦‘锦带’与绿叶地锦(贵州野生种)的相似系数最小(0.515 2)。在相似系数为 0.55 处,2 份绿叶地锦材料与 2 份花叶地锦材料可以完全分开。另一类包括异叶地锦、栓翅地锦、地锦和三叶地锦。其中,异叶地锦与栓翅地锦的相似系数最大(0.888 9),栓翅地锦与三叶地锦的相似系数最小(0.533 3)。在遗传相似系数为 0.55 处,三叶地锦可与其他 3 份材料分开。

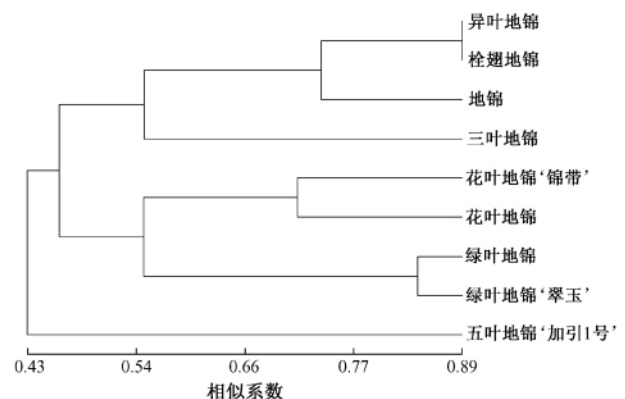


图 2 基于 ISSR 的 9 份地锦属植物材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA cluster diagram of 9 germplasms of *Parthenocissus* based on ISSR

3 结论与讨论

9份地锦属植物材料的 ISSR 扩增可以得到清晰的条带,多态性条带百分率达 95.9%,表明地锦属的遗传多样性水平较高。7条引物能够很好地将全部供试材料区分开。其中,引物 813、824、815、829 分别单独使用就能够区分开地锦属 6 个野生种、1 个引进种和 2 个驯化栽培品种的全部 9 份供试材料,而引物 825、866、814 可分别区分开 7~8 个供试材料。表明了筛选出的 7 条 ISSR 引物对供试材料表现出了很高的鉴定效率。

在 9 份地锦属植物材料中,五叶地锦‘加引 1 号’为国外引入的栽培品种,其余 8 份材料均为国内的栽培品种或野生种。五叶地锦‘加引 1 号’与其余 8 份材料的相似性都较低,并在相似系数 0.43 处单独分离出来。这说明种源地对亲缘关系的远近具有较大影响。

8 份源自国内的材料,在遗传相似系数为 0.46 处,花叶地锦‘锦带’、花叶地锦、绿叶地锦‘翠玉’和绿叶地锦聚为一类,异叶地锦、栓翅地锦、地锦和三叶地锦聚为另一类。在形态上,这 2 类之间也具有明显的区别:前者叶型都为 5 小叶复叶,且卷须嫩时顶端都卷曲呈钩状;后者叶型都非 5 小叶复叶(为 3 小叶复叶、单叶或两者兼有),且卷须嫩时顶端都膨大为圆珠形。另外,绿叶地锦栽培品种‘翠玉’(由源自安徽野生种选育)与绿叶地锦野生种(源自贵州)具有相似的表现形态,两者 ISSR 分析的遗传相似系数在 5 小叶型复叶类的栽培品种及野生种中也是最大的(0.842 1);同样,花叶地锦栽培品种‘锦带’(由源自河南的野生种选育)与花叶地锦野生种(源自贵州)也具有较大的相似系数(0.714 3),但二者表现形态的差别较之‘翠玉’与绿叶地锦野生种的差别大,两者的遗传相似系数较 2 份绿叶地锦材料来说也要小一些。栓翅地锦为单叶,异叶地锦和地锦具有两型叶,且在两型叶中,3 小叶复叶只在植株基部着生,单叶为主要的叶型,因此,从表现形态上看,异叶地锦、栓翅地锦、地锦三者更为相近,而三叶地锦仅有 3 小叶复叶,其在相似系数为 0.55 处可与其他 3 份材料分开。以上分析表明,ISSR 分子标记的聚类结果与形态学上的分类结果是基本一致的,能很好地揭示种或品种间的差异,在地锦属种质资源分类和鉴定上具有一定的准确性。

在本文研究中,也有 ISSR 分析结果与形态特征表现不相符的现象。比如五叶地锦‘加引 1 号’,在叶型、叶色等表现性状上均与绿叶地锦最为接近,但它却与地锦的遗传相似系数最高(0.508 5),而与绿

叶地锦‘翠玉’和绿叶地锦(贵州野生种)的遗传相似系数分别仅为 0.379 3 和 0.301 9。这可能与 ISSR 引物的选取及引物数量等因素有关^[12]。

目前,国内的地锦属植物品种选育工作尚处在起步阶段,随着以后更多新品种的出现,只靠形态学手段难以将品种区分开来。利用 ISSR 分子标记构建地锦属种质资源的 DNA 指纹图谱,将可以作为品种鉴定及新品种 DUS 测试的有效手段。据相关文献^[13-14]报道,分子标记方法的评价结果易受样本代表性程度、引物选取及数量的影响,并不能完全取代形态学方法在品种鉴定上的重要作用。因此,需综合形态学和分子标记的方法进行分析,从而达到合理鉴定品种以及分类的目的。

参 考 文 献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 48 卷第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 付彦荣, 孙振元, 赵梁军. 爬山虎属植物资源及其园林应用[J]. 北京园林, 2006, 22(1): 20-24.
- [3] 付彦荣. 地锦和五叶地锦的种间杂交技术及辐射生物学效应研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [4] 李正红. 地锦与五叶地锦种质创新研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2005.
- [5] 朱岩, 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.
- [6] 沈永宝, 施季森, 赵洪亮. 利用 ISSR DNA 标记鉴定主要银杏栽培品种[J]. 林业科学, 2005, 41(1): 202-204.
- [7] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3735-3740.
- [8] HERRERA R, CARES V, WILKINSON M J, et al. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and inter simple sequence repeat markers[J]. *Euphytica*, 2002, 124(1): 139-145.
- [9] MORENO S, MARTIN J P, ORTIZ J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm[J]. *Euphytica*, 1998, 101(1): 117-125.
- [10] 逄卫国. 葡萄不同部位提取 DNA 的方法研究[J]. 山西师范大学学报(自然科学版), 2002, 16(1): 63-65.
- [11] 夏惠. 葡萄品种遗传多样性的 RAPD 分析[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [12] CHARTERS Y M, ROBERTSON A, WILKINSON M J, et al. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeats (SSR) primers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92(3-4): 442-447.
- [13] 王皎, 刘崇怀, 樊秀彩, 等. 葡萄种类和品种鉴定技术研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 401-405.
- [14] ARGADE N C, TAMHANKAR S A, KARIBASAPPA G S, et al. DNA profiling and assessment of genetic relationships among important seedless grape (*Vitis vinifera*) varieties in India using ISSR markers[J]. *Plant Biochemistry & Biotechnology*, 2009, 18(1): 45-51.

(责任编辑 董晓燕)