

基于 ISSR 图谱构建华中利川 和华东苏杭莼菜品种的分子身份证

董翔 马梦雪 刘虹 覃瑞 夏婧 余光辉 龚汉雨 李刚

中南民族大学生命科学院/武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074

摘要 采用 ISSR 分子标记技术获得华中利川莼菜和华东苏杭莼菜品种间的 DNA 指纹图谱, 以构建其分子身份证。利用莼菜基因组 DNA 的 ISSR 扩增带型多态性分析数据, 对居群间 UPGMA 聚类分析显示 6 个莼菜居群形成华中利川和华东苏杭 2 个分支。个体间 UPGMA 聚类分析也显示华中利川 3 个居群的 23 个莼菜个体聚类成一个分支, 而华东苏杭 3 个居群的 23 个个体聚类成另一分支。其中, 3 条核心 ISSR 引物 (P817、P825、P845) 扩增产生的指纹图谱, 可用于构建苏杭莼菜和利川莼菜 2 个地域性品种特异的分子身份证。研究结果表明: ISSR 标记用于鉴别华中利川和华东苏杭莼菜品种种质资源是有效的, 同时揭示了地理位置的隔离及气候地带的差异化与它们在分子水平上的分化是一致的; 采用多种分子标记联合构建不同莼菜品种的分子身份证数据库, 并与传统性状特征相结合, 将有利于更准确地鉴定莼菜品种资源。

关键词 莼菜; 种质资源; ISSR; 分子身份证

中图分类号 S 645.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0050-08

莼菜 (*Brasenia schreberi*) 为多年生水生植物和重要水生经济作物, 隶属睡莲科或水盾草科或莼菜科^[1-2]。长期以来, 特别是近几十年来, 由于人类活动导致的生境破坏和过度开发利用, 莼菜的自然群落面积与居群数量急剧减少, 濒临灭绝, 已被列为国家一级重点保护濒危野生植物^[3]。

莼菜很早就被奉为珍贵食品, 其主要食用部分是富含胶质而未展开的幼嫩卷叶, 含有丰富的多糖、蛋白质、维生素和微量元素, 并具有很高的药用价值^[4-5]。在我国, 莼菜主要产于浙江西湖地区、江苏太湖地区和湖北利川等地区^[4]。其分布区域气候特点表现为低海拔、亚热带季风性气候, 如浙江西湖地区、江苏太湖地区; 或高海拔、高寒、垂直地带性气候, 如湖北省利川 (海拔 1 200~1 400 m 左右)。在不同气候带形成了不同的莼菜品种, 具有不同的品质特征。目前对莼菜品种的鉴别主要是依据植株的形态特征, 如花色、叶片正面和背面的颜色等^[6], 但有时也很难利用这些表型特征进行区分。例如, 西湖莼菜品种和利川莼菜品种的花都为红色, 叶片正面和背面的颜色虽然有些区别, 但差别不明显。

近年来国内外有关莼菜的研究主要涉及莼菜栽培、食用和药用价值^[5-8]、植物群落生态^[9]、基于分子标记和基因测序的遗传多样性分析^[1, 10]以及毒理生态^[11]等方面的研究, 但从分子生物学角度对莼菜品种进行鉴定报道较少。本研究采用 ISSR 分子标记技术获得不同莼菜品种 DNA 指纹图谱, 以构建其分子身份证, 以期用于鉴定不同莼菜品种, 以克服形态学上鉴别的不足, 为莼菜种质资源的科学利用与开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植株采集和 DNA 提取

莼菜植株材料采自 6 个不同地区, 分别为华中地区的利川忠路 (LCZ)、利川福宝山 (LCF) 和利川白河岭 (LCY), 华东地区的杭州西湖大清谷 (SDS)、杭州周浦 (HZZ) 和苏州东山 (HZD)。在莼菜开花期间, 共采集上述 6 个不同地方的 46 株莼菜的新鲜幼嫩叶片, 每株 5~10 g (表 1)。对于自然居群采集的样本数目较多, 而人工种植居群仅少量采样 (如利川白河岭等), 因此, 取样数目差别较大 (2~15)。由

收稿日期: 2017-12-07

基金项目: 科技部基础性工作专项 (A 类) (2014FY110100); 国家自然科学基金青年项目 (31401607)

董翔, 硕士研究生. 研究方向: 遗传学和生物资源. E-mail: directx0831@163.com

通信作者: 李刚, 博士, 副教授. 研究方向: 植物遗传学和植物种质资源学. E-mail: lglg863@163.com

于莼菜主要营克隆(无性)繁殖,而且其地下茎在水中为丛生状、多分枝,因而采样时尽量间隔一定距离取样,以避免相邻的取样其实为同一株莼菜。将每份幼嫩叶样本置于装有硅胶的密封袋中迅速干燥,

备用。采用 CTAB 法提取上述不同品种的莼菜幼叶的基因组 DNA [12],采用核酸蛋白分析仪(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)测定样品 DNA 纯度,用 TE 溶液保存备用。

表 1 6 个莼菜居群取样数目和原产地生境特征

Table 1 The sampling numbers of six *Brasenia schreberi* populations and their original habitats' characteristics

居群代码 Population codes	地点 Sites	海拔/m Altitude	经纬度(N/E) Longitude/Latitude	生境 Habitats	面积/m ² Area	取样株数 Sampling numbers
SDS	苏州东山 Dongshan, Suzhou	3.5	31°03' / 120°23'	池塘 Pond	150~160	9
HZC	杭州大清谷 Daqinggu, Hangzhou	29.3	30°07' / 120°04'	稻田 Rice field	100~120	6
HZD	杭州周浦 Zhoupu, Hangzhou	62.9	30°11' / 120°03'	稻田 Rice field	200~250	8
LCZ	利川忠路 Zhonglu, Lichuan	1 200	30°10' / 108°43'	稻田 Rice field	30~40	6
LCF	利川福宝山 Fubaoshan, Lichuan	1 474	30°12' / 108°43'	池塘 Pond	1 000~1 200	15
LCY	利川白河岭 Baiheling, Lichuan	1 475	30°12' / 108°42'	池塘 Pond	40~50	2

1.2 ISSR-PCR 扩增

从购自上海生工生物工程公司的 60 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、重复性较好的 6 条引物用于 PCR 扩增和品种的鉴定。这 6 条引物分别是 P810、P817、P825、P834、P845 和 P848,其序列见表 2。扩增反应在 PTC-100^R 扩增仪上进行。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1.5 min,35 个循环;循环结束后,72 °C 延伸 7 min,以保证延伸彻底;最后 4 °C 保存。反应总体积为 25 μL,包括 0.25 mmol/L 的 dNTPs、1.5 mmol/L 的引物、2.5 U *Taq* 酶和 4 μL (10 ng) 的 DNA 模板。将 PCR 产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离,在凝胶成像系统中拍照保存。

表 2 ISSR 引物名称及其序列

Table 2 ISSR primer names and its sequences

引物名称 Primer names	序列 (5'-3') Sequences
P810	(GA) ₈ T
P817	(CA) ₈ A
P848	(CA) ₈ (A/T)G
P825	(AC) ₈ T
P834	(AG) ₈ (C/G) T
P845	(CT) ₈ (A/T)G

1.3 数据统计分析

ISSR-PCR 扩增产物按条带的有无分别进行 0、1 数据处理,在相同迁移位置上有条带的(包括弱带)记为“1”,无条带的记为“0”。采用 POPGEN version 1.32 版软件[13]计算居群间的遗传一致度和

Nei's 遗传距离。采用 WINAMOVA1.55 软件[14]分析 6 个居群间、居群内和 2 个区域间(华中和华东地区)的分子变异(AMOVA)。显著性检验通过 1 000 次置换进行。利用软件 NTSYSpc 2.02 [15] 中的 Jaccard 系数计算各自样品之间的条带相似性,并对样品间的遗传关系进行 UPGMA (无权重配对算术平均数法)聚类分析。同时,为了评价居群间的遗传关系,利用软件 NTSYSpc 2.02 [15],根据 Nei's 遗传距离对 6 个居群间的遗传关系也进行了 UPGMA 聚类分析。

1.4 不同品种特异分子身份证模式的构建

以其中能够稳定产生华东苏杭和华中利川莼菜特异带型的 3 条 ISSR 引物(P825、P845、P817)作为鉴别不同品种的核心引物,形成莼菜品种资源的 ISSR 指纹图谱,构建鉴别苏杭莼菜品种和利川莼菜品种的特异的分子身份证模式。

2 结果与分析

2.1 居群间和区域间莼菜分子变异分析

共计 46 份莼菜样本来自 6 个居群,分别属于华中和华东地区 2 个大的区域。首先,利用不同居群莼菜 ISSR 数据进行分子变异(AMOVA)分析,结果表明居群间遗传分子变异有显著性差异($P < 0.001$) (表 3)。在总的遗传变异中,85.6% 的分子变异来源于居群间,而仅有 14.4% 的变异来源于居群内部。其次,对两大区域(华东与华中地区)间的莼菜 ISSR 数据进行分子变异分析表明,区域

间分子变异的比率为 81.2%，也达到显著性差异 ($P < 0.001$)，而来源于区域内部的分子变异仅为 18.8%。采用巢式分析法 (nested analysis) 综合分析区域间、居群间以及居群内部的分子变异显示：2 个大的区域间分子变异的比率为 74.4%，区域居群间变异的比率为 14.9%，区域居群内变异的比率为

10.7%，分子变异都达到显著性差异 ($P < 0.001$)。分析结果表明这些莼菜的分子变异主要来源于区域的不同，即不同区域自然地理特征差异是造成其分子变异的主要因素，其次是区域内居群间的分离产生了一定的分子变异，而居群内部不同莼菜个体间的分子变异比率最小。

表 3 基于 ISSR 分析数据的莼菜分子变异 (AMOVA)

Table 3 AMOVA analysis of *Brasenia schreberi* based on ISSR data

AMOVA 分析方法 AMOVA methods	变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平均方差 Average variance	变异组分/% Variant components	占总变异比率/% Percentage among total variation	显著性(P) Significance
居群间分析 Analysis among populations	居群间 Among populations	4	35.2	4.0	85.6	<0.001
	居群内 Within populations	41	0.7	0.7	14.4	<0.001
区域间分析 Analysis among regions	区域间 Among regions	1	116.8	5.0	81.2	<0.001
	区域内 Within regions	44	1.2	1.2	18.8	<0.001
巢式分析 Nested analysis	区域间 Among regions	1	116.7	4.6	74.4	<0.001
	居群间 Among populations	3	8.1	0.9	14.9	<0.001
	居群内 Within populations	41	0.7	0.7	10.7	<0.001

2.2 莼菜居群间遗传距离和遗传相似度分析

利用软件 NTSYSpc 2.02 对莼菜不同居群间遗传距离和遗传相似度比较分析，结果显示不同莼菜居群间的遗传一致度的范围为 0.69~0.99 (图 1A)，遗传距离变化范围为 0.01~0.37 (图 1B)。居群 LCF 与居群 LCY、LCZ 之间的遗传距离表现最小，为 0.01；同时，居群 LCF 与 LCY、LCZ 之间的遗传一致性最大 (0.99)；而居群 LCY 与居群 HZD 之间遗传距离表现最大，为 0.37，这 2 个居群间遗传一致性则最小 (0.69)。值得注意的是居群之间的遗传差异化程度表现出与地理距离大小变化相关。在同一区域内，如华中地区 3 个居群之间的地理距离为 22~30 km (图 1C-I)，华东地区 3 个居群之间的地理距离为 23~113 km (图 1C-II)，各自区域内居群间的距离相对较近。比较发现区域内部居群之间的遗传距离变化范围为 0.01~0.11，遗传距离很近；其遗传一致度变化范围为 0.90~0.99，表现出很高的相似度。而在两大区域之间，不同居群相对的地理距离为 1 080~1 142 km (图 1C-III)，两两居群之间相距较远。通过比较发现不同区域居群之间的遗传距离都在 0.20 以上，其变化范围为 0.20~0.37，遗传距离相对较远；其遗传一致度都低于 0.90，变化范围为 0.69~0.82，表现出相对较低的相似度。所以从图 1

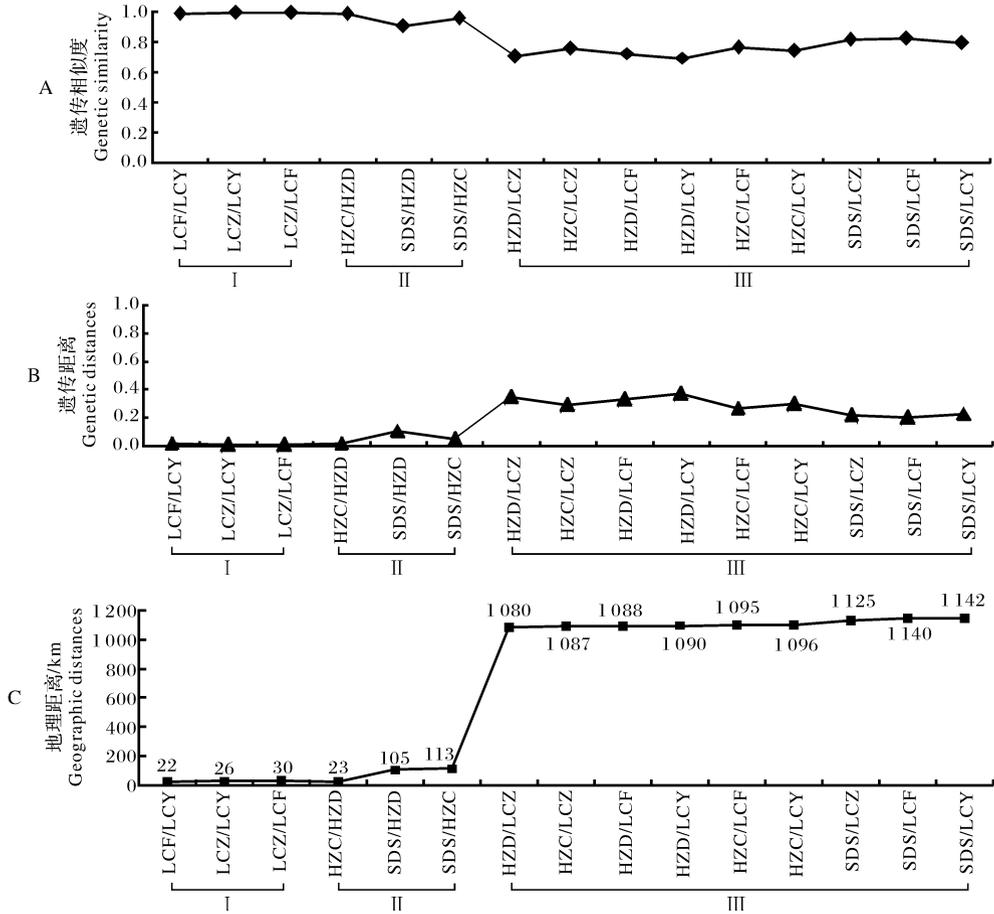
分析可以看出，居群间的遗传距离大小总体上与地理距离大小有正相关趋势，地理距离的加大促进了不同莼菜居群间遗传距离的加大，不过没有表现出固定的比例关系。而居群之间的一致度系数则与它们之间的地理距离大小有负相关趋势，地理距离的加大导致了居群间遗传一致度的降低，增加了遗传的差异化。

2.3 莼菜居群与个体的聚类分析

利用无权重配对算术平均数法 (UPGMA) 对 6 个莼菜居群进行聚类分析，结果显示在遗传距离为 0.28 处 6 个居群明显形成 2 个分支，华东地区的 3 个莼菜居群 (SDS、HZD、HZC) 成为一支，而华中地区的 3 个莼菜居群 (LCF、LCZ、LCY) 成为另一支 (图 2A)。同样，根据 Nei's 遗传距离系数，对 6 个居群中的所有 46 个莼菜个体进行了 UPGMA 聚类分析，结果显示在遗传距离为 0.75 处也形成 2 个分支，来自华东地区 3 个居群的 23 个个体聚成一支，来自华中地区 3 个居群的 23 个个体聚成另一支 (图 2B)。因此，从居群水平和个体水平上华中地区莼菜品种和华东地区莼菜品种都表现出与地理区域隔离相一致的差异，说明长期长距离的地理隔离造成了华中莼菜和华东莼菜各自形成了独立的遗传进化种群，分别在相异的自然生境条件下积累了不同的分子变异。仔细比较华中和华东内部莼菜居群，

可以看出华中内部莼菜居群采样点之间的距离较近 (22~30 km), 居群之间的遗传差异相对较小, 居群内个体在内部小分支上分散分布; 华东内部莼菜居群采样点之间的距离较远 (23~113 km), 居群之间的遗传差异相对较大, 居群内个体在内部小分支上

分布呈现 SDS 居群与 HZD 居群相互分离, 在遗传距离约为 0.88 处形成 2 个亚分支, 而居群 HZC 在上述 2 个亚分支上都有分布。不同莼菜品种在聚类分析上的这些差异进一步体现了地理隔离对莼菜分子变异的影响。



A: 遗传相似度 Genetic similarity; B: 遗传距离 Genetic distances; C: 地理距离 Geographic distances.

图 1 不同地理距离的莼菜居群间遗传距离和遗传相似度分析

Fig.1 The analysis of genetic distances and genetic similarity among different *Brasenia schreberi* populations with certain geographic distances

2.4 ISSR 指纹图谱和特异性 DNA 谱带和特异的分子身份证

在 6 条 ISSR 引物中, 引物 P817、P825、P845 扩增的 ISSR 指纹图谱呈现出特异性 DNA 谱带, 能分别鉴别苏杭莼菜品种和利川莼菜品种 (图 3)。用引物 P817 扩增能够在所有莼菜群体中产生 9 条谱带, 其中 4 条谱带为苏杭莼菜所特有 (P817-1000、400、250、200), 3 条谱带为利川莼菜所特有 (P817-800、550、490), 只有 2 条谱带为所有莼菜共有 (P817-1300、900)。用引物 P825 扩增能够产生 6 条谱带, 其中 4 条谱带为所有莼菜共有 (P825-800、620、470、

390), 利川莼菜多了 2 条特异谱带, 分别是 P817-930 和 P817-300。用引物 P845 扩增能够产生 9 条谱带, 也是其中 4 条谱带为苏杭莼菜多特有 (P845-1050、870、400、200), 3 条谱带为利川莼菜所特有 (P848-780、500、320), 2 条谱带为所有莼菜共有 (P845-1300、250)。利用 46 份供试莼菜产生的这些扩增谱带构建的华中利川莼菜品种和华东苏杭莼菜品种的分子身份证模式如图 4, 这 3 条核心引物均可作为鉴定苏杭莼菜品种和利川莼菜品种特异的分子标记, 使得每个品种都能产生唯一的指纹图谱。

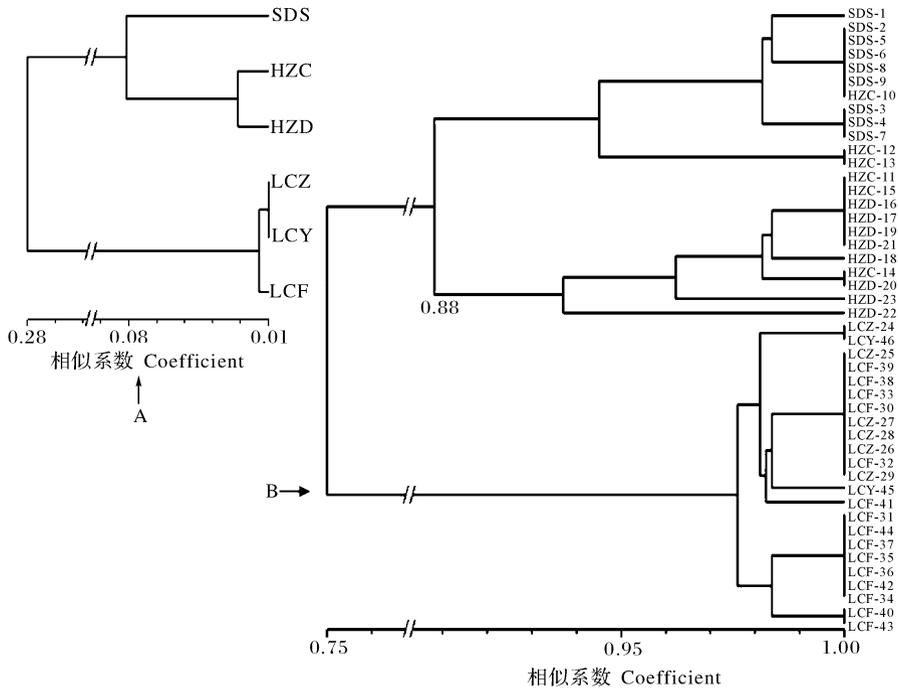


图 2 不同菹菜居群间(A)及其个体间(B)的UPGMA聚类

Fig.2 The UPGMA analysis of different *Brasenia schreberi* populations (A) or individuals (B)

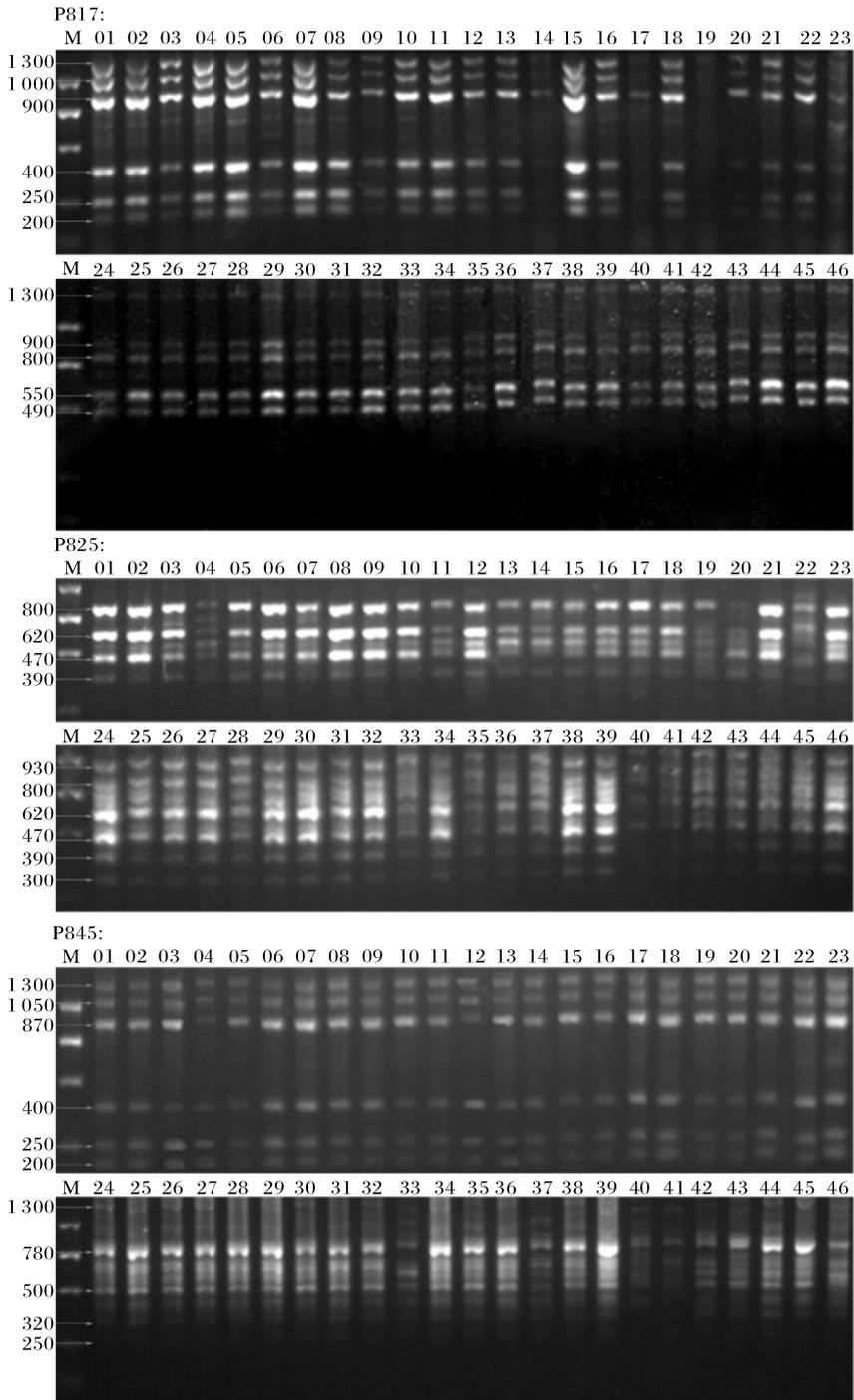
3 讨论

菹菜种质资源可分为不同的品种,例如袁居正^[6]将菹菜分为红花和绿花 2 个品种,张雷等^[16]认为菹菜有西湖红叶菹菜、太湖绿叶菹菜、利川红叶菹菜、马湖菹菜等 4 个品种,陈振华等^[17]则认为可分 5 个品种。由于这些学者基本上依据菹菜的花色、叶片、嫩梢和卷叶的颜色等形态特征以及地域性进行菹菜品种的划分,因而导致划分的品种不一致。目前愈来愈多的研究者开始注重将传统的性状特征和基因分析结合起来开展分子系统学研究和种质资源品种鉴定研究^[18]。近年来,分子标记如 RAPD、ISSR、SSR、SRAP、AFLP 等已在植物种质资源研究及品种鉴定和保护中得到了成功的应用^[19-22]。本研究基于 ISSR 分析数据的 AMOVA 分析显示,在菹菜的分子遗传变异中绝大部分变异来源于区域间(81.16%),仅有少部分遗传变异来源于区域内(18.84%),揭示华中和华东 2 个传统菹菜种植区域间的菹菜存在明显的分子遗传差异。巢式综合法则揭示不同来源的菹菜分子变异比率为:区域间(74.4%)>居群间(14.9%)>居群内(10.7%)。结果也表明菹菜的分子变异主要因素是不同区域自然地理隔离和生境特征的差异造成了其分子变异,其次是区域内居群间的隔离也形成了一些不同的分子

变异,而居群内部不同菹菜个体间的自发突变、异交等产生的个体变异比率最小。

结合地理距离大小的差异比较分析居群间的遗传距离和遗传相似性系数,结果显示遗传距离大小总体上与地理距离大小有正相关趋势,而一致度系数则与地理距离大小有负相关趋势,或者说是地理距离的加大促进了不同菹菜居群间遗传距离的加大,增加了遗传的差异,降低了遗传一致度系数。采用基于 ISSR 分子数据的 UPGMA 聚类分析显示,无论在居群水平还是个体水平都形成华东苏杭菹菜和华中利川菹菜两大分支,说明它们在分子水平上已经发生了显著的差异。华东苏杭菹菜和华中利川菹菜发生分子水平上的分歧主要是由内因和外因共同作用的结果。菹菜的繁殖主要是利用根状茎进行营养繁殖,但是也开花并通过虫媒异交繁殖。遗传物质的自然突变是个体间分子变异产生的内部原因,而异交引起的遗传物质交流既是个体间产生变异的动力,也导致了居群内部个体间的遗传平衡,使得分子变异在异交群体内扩散、保留,形成独特的居群结构特征,从而产生了居群间的差异。菹菜的生长生存要适应于所处的地理环境,在其进化历程中不断受到地理环境因子(如温度、湿度、降水、阳光等)的影响。不同环境条件对菹菜进化的选择作用不尽相同,即对菹菜遗传物质的自然变异频率、虫媒

异交行为等产生不同影响,因而导致产生了不同区域 进化过程中不断积累,形成了现在不同区域莼菜在 域的莼菜在分子变异上的差异。而这些变异在长期 分子水平上的巨大差异。



灰色箭头指向的条带为特征带,其左侧数据为条带大小,bp; M;DL2000 DNA Marker。泳道 1~9:苏州东山莼菜 (SDS); 10~15:杭州周浦莼菜 (HZC); 16~23:杭州西湖大清谷莼菜 (HZD);24~29:利川忠路莼菜(LCZ);30~44:利川福宝山莼菜 (LCF);45~46:利川白河岭莼菜(LCY)。The gray arrows point to the special bands,and its behind numbers are the molecular sizes;M;DL2000 DNA ladder.Lane 1-9;SDS samples; 10-15;HZC samples; 16-23;HZD samples; 24-29;LCZ samples; 30-44;LCF samples; 45-46;LCY samples.

图 3 ISSR 核心引物扩增产生的谱带

Fig.3 The PCR band-patterns amplified by the core ISSR primers

- ization of microsatellite loci in *Brasenia schreberi* (Cabombaceae) based on the next-generation sequencing[J]. Genet Mol Res 2016, 15(2):1-5.
- [11] 杨顶田, 施国新, 宋东杰, 等. 蕹菜 (*Brasenia schreberi*) 冬芽对 Cr⁶⁺ 污染的抗性反应[J]. 湖泊科学, 2001, 13 (2):169-174.
- [12] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Focus, 1987, 12:13-15.
- [13] YEH F C, YANG R, BOYLE T J. PopGene32: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis (version 1.32)[M]. Alberta: Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, 2000.
- [14] EXCOFFIER L. Analysis of molecular variance (AMOVA) Version 1.55[M]. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.
- [15] ROHLF F J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02[M]. New York: Exeter Software, Setauket, 1998.
- [16] 张雷, 王凌云, 陈淑玲. 蕹菜的特征特性及栽培管理技术[J]. 现代农业科技, 2015(12):101-102.
- [17] 陈振华, 徐应英, 王凌云. 5个蕹菜品种资源的特征特性及品质比较试验[J]. 现代农业科技, 2015(16):97-98.
- [18] BICKFORD D, LOHMAN D J, SOHDI N S, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation[J]. Trends Ecol Evol, 2007, 22(3):148-155.
- [19] 郑海燕, 粟建光, 戴志刚, 等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17):3499-3510.
- [20] 李丽, 何伟明, 马连平. 用 EST-SSR 分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1):76-88.
- [21] 刘丹丹, 逯晓萍, 张瑞. 丹草种质资源 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(2):72-76.
- [22] 刘昔辉, 张荣华, 张革民, 等. 基于 AFLP 标记的河八王种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4):7-13.
- [23] QIAN W, GE S, HONG D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:440-449.

Constructing molecular ID cards of amaranthus species in Lichuan, Central China, and SuHang, East China based on ISSR map

DONG Xiang MA Mengxue LIU Hong QIN Rui
XIA Jing YU Guanghui GONG Hanyu LI Gang

*Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special
Plant Germplasm in Wuling Area of China /*

College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to construct DNA fingerprint patterns and molecular identity of *Brasenia schreberi* germplasm, an endangered aquatic plant in China. The result of UPGMA cluster analyses showed that three *B. schreberi* populations (SDS, HZD, HZC) from East China were clearly separated from the three populations (LCZ, LCF, LCY) from Central China. The UPGMA cluster analysis of 46 individuals of *B. schreberi* showed that samples from the same geographical region (Central China or East China) formed a group, whereas samples from different regions were separated. Three core ISSR primers (P817, P825, P845) can be used to amplify the special band-patterns of two *B. schreberi* varieties (SuHang and Lichuan), and therefore can be used for establishing molecular identity of *B. schreberi* germplasm. The differentiation at the molecular level of *B. schreberi* germplasm is consistent with their geographical isolation and diversity climate zone. It is recommended that the use of a variety of molecular markers to construct a molecular ID card database of different *B. schreberi* species, combined with the characteristics of traditional traits, will facilitate the more accurate identification of *B. schreberi* varieties resources.

Keywords *Brasenia schreberi*; germplasm; ISSR; molecular identity

(责任编辑:张志钰)