

# 高效能源植物绿玉树种质资源 遗传多样性的 ISSR 分析

黄文霞, 何 仪, 何觉民, 莫俊杰, 陆建农, 刘召亮, 周鸿凯

(广东海洋大学农业生物技术研究所, 湛江 524088)

**摘要:**为了揭示绿玉树种质间的差异, 应用 ISSR 标记对国内 12 份绿玉树品系的亲缘关系进行了分析, 结果表明: 12 份绿玉树品系的遗传相似系数在 0.53~0.98 之间, 且明显分为 2 个类群, 而第二类群又可分为 5 个亚类群; 我国绿玉树种质间存在丰富的遗传变异。本研究为对绿玉树进行有效的遗传改良提供了基础。

**关键词:**绿玉树; ISSR; 种质资源; 遗传多样性

## ISSR Analysis of Genetic Diversity of the Germplasm of an Efficient Energy Plant *Euphorbia tirucalli* L.

HUANG Wen-xia, HE Yi, HE Jue-min, MO Jun-jie, LU Jian-nong, LIU Zhao-liang, ZHOU Hong-kai

(Institute of Agricultural Biotechnology of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

**Abstract:** In order to reveal the genetic differences of the *Euphorbia tirucalli* germplasms, the genetic diversity of 12 *Euphorbia tirucalli* L. strains was analyzed using ISSR marker. The results showed that the genetic similarity among them ranged from 0.53 to 0.98, and these 12 germplasms were classified into 2 groups and the second group could be further classified into 5 sub-groups. The genetic diversity of *Euphorbia tirucalli* germplasm is rich in China. This research established a foundation for the effective genetic improvement of *Euphorbia tirucalli* L.

**Key words:** *Euphorbia tirucalli* L.; ISSR; Germplasm resources; Genetic diversity

现代燃料油植物研究工作始于 20 世纪 50 年代末 60 年代初, 发展于 70 年代, 80 年代以来植物燃料油研究有了很大进展。美国、巴西、日本、印度、菲律宾、澳大利亚、芬兰等国家, 在燃料油植物改性和燃料油的研制使用技术上走在世界的前列<sup>[1]</sup>。我国燃料油植物研究起步较晚, 仍处于资源调查、种类筛选、油脂成分的分析阶段, 且大多局限于对种子油的研究开发, 而以产乳胶植物作为能源植物进行开发利用的研究甚少。1976 年 Maugh<sup>[2]</sup> 在《Science》上发表文章指出绿玉树和同属植物续随子 (*E. lathyrus*) 的乳汁中含有碳氢化合物, 与石油的成分类似, 绿玉树的枝条富含乳汁, 且可以直接与其他物质混合成生物柴油, 作为燃料油替代石油。绿玉树

鲜乳汁中富含烯、萜、醇、异大戟二烯醇 ( $C_{30}H_{50}O$ )、天然橡胶、三十一(碳)烷和三十一烷醇等 12 种烃类物质, 不含硫, 且有毒、有害气体释放量低, 被称为“绿色”石油树, 其中甾醇三帖类 (sterol triterpenes) 含高能, 碳氧比为 10:1, 在含能上接近或超过汽油<sup>[1,3-5]</sup>, 因此与同属植物续随子被选定为“生物燃料油林”的造林树种。

绿玉树既是非洲干旱地区重要的能源植物<sup>[6]</sup>, 又是一种集水土保持、药用、观赏、工业原料、环境绿化于一体, 具有生态、能源、经济等综合效益的多功能树种。绿玉树耐盐碱, 抗台风, 在我国主要分布在滨海地区, 因此绿玉树还是海洋环境的保护者。Maugh 的文章引起了人们对绿玉树的极大兴趣, 美国、欧洲南部以及其他部分国家, 纷纷开展了绿玉树

收稿日期: 2009-06-02

修回日期: 2009-12-11

基金项目: 广东省科技攻关计划 (2009B020303009)

作者简介: 黄文霞, 硕士研究生, 主要从事作物学研究, 现在山东省东营市农业局工作。E-mail: 23-xiaohuang@163.com

通讯作者: 何觉民, 教授, 硕士, 主要从事植物遗传育种研究。E-mail: hejm@gdou.edu.cn

的引种和研究工作。但由于绿玉树在原产地以外极少开花,因此人类引种多采用枝条扦插的方式<sup>[6]</sup>。营养体繁殖方式使得来源不同的绿玉树品系间几乎不存在遗传差异,对绿玉树进行遗传改良具有重大意义,而有效的遗传改良必须建立在具有存在遗传差异的品种之上。

ISSR(inter-simple sequence repeat)是继 SSR 后发展出来的一项新型分子标记技术,该技术利用了 RAPD 技术的优点和基因组中丰富的 SSR 序列信息,且克服了 RFLP 和 RAPD 的技术性限制,具有比 RAPD 更高的可重复性和稳定性,多态性产物也更为丰富。目前已广泛用于种群生物学分类、进化、品种鉴定、物种亲缘关系及遗传多样性等方面的研究<sup>[7-18]</sup>。

本研究利用 ISSR 分子标记技术对 12 份绿玉树品系进行亲缘关系分析,以便揭示不同来源绿玉树种质资源的遗传多样性,为对绿玉树进行有效的改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的 12 份绿玉树品系(表 1),由广东海洋大学农业生物技术研究所提供。

表 1 供试品系

Table 1 The strains used in the experiment

编号 Code	名称 Name	来源 Source	编号 Code	名称 Name	来源 Source
1	霞山	广东省湛江市霞山区	7	吴川 7	广东省吴川市
2	吴川 2	广东省吴川市	8	坡头	广东省湛江市坡头区
3	吴川 3	广东省吴川市	9	海南	海南省三亚市
4	吴川 4	广东省吴川市	10	云南	中科院昆明植物园
5	吴川 5	广东省吴川市	11	上海	上海植物园
6	吴川 6	广东省吴川市	12	南亚所	中国热带农业科学院南亚所

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应及电泳 采用 20μl 的反应体系进行 PCR 扩增,反应体系中,Taq 酶 0.3μl,10 × Buffer 2μl,模板 DNA 50μg/ml 1μl,10mmol/L dNTP 0.15μl,引物 10μmol/L 1μl,加水补齐至 20μl。扩增程序为:94℃ 预变 5min;94℃ 变性 30s,50℃ 退火 30s,72℃ 延伸 2.5min,37 个循环;最后 72℃ 延伸 5min,20℃ 终止反应。PCR 产物进行 5% 非变性聚

丙烯酰胺凝胶电泳,银染后读带。

1.2.2 数据分析 电泳结果的每条 DNA 谱带为 1 个单位,同一 ISSR 位点上有带记为 1,无带记为 0,统计结果以 1、0 矩阵输入计算机,用 NTSYS-ps 软件处理数据,并对品系进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

用编号为 5、8 的两份绿玉树品系的基因组总 DNA 对 60 条 ISSR 引物进行筛选,其中有 12 条引物能扩增出条带清晰且具多态性的带型,见表 2。

表 2 ISSR 分析所用引物序列和扩增结果

Table 2 The primers and amplified results of ISSR analysis

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增条 带数 Total band number	多态性 带数 Polymorphic band number	多态性百 分率(%) Percentage of polymorphic band
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T	8	4	50.00
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	4	1	25.00
UBC819	(GT) <sub>8</sub> C	10	6	60.00
UBC826	(AC) <sub>8</sub> G	15	12	80.00
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	9	6	66.67
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC	12	8	66.67
UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	5	2	40.00
UBC842	(GA) <sub>8</sub> YG	3	3	100.00
UBC855	(AC) <sub>8</sub> YT	4	2	50.00
UBC860	(TG) <sub>8</sub> RA	5	5	100.00
UBC868	(GAA) <sub>5</sub>	3	2	66.67
UBC891	HVH(TG) <sub>7</sub>	7	4	57.14

由表 2 可知:12 条引物中 (AG)<sub>n</sub> 有 4 条,(AC)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub> 和 (TG)<sub>n</sub> 各有 2 条,说明绿玉树基因组中存在大量的 (AG)、(AC)、(GA) 与 (TG) 二核苷酸重复序列。12 条引物共计扩增出 85 个条带,且条带清晰明亮(图 1),其中,多态性条带 55 条,多态性百分率为 64.71%,每个引物扩增的 DNA 条带数在 3~15 之间,平均 7.08 条。扩增条带数最多的引物为 UBC826,达 15 条,扩增条带数最少的引物为 UBC842 与 UBC868,扩增条带为 3 条。其中,多态性百分率最高的为 UBC842 和 UBC860,达 100%,最低的为 UBC809,为 25%。以上数据表明,所选用的 12 条引物均能独立地将 12 份绿玉树品系区分开来。

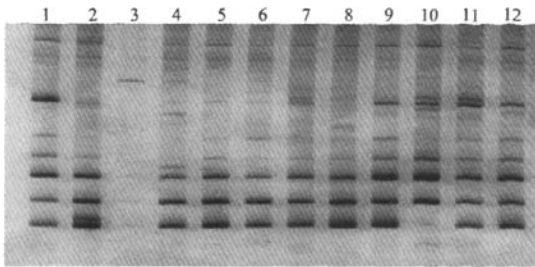


图1 引物 UBC835 在不同绿玉树品系中的 ISSR 图谱(图中数字为品系编号)

Fig.1 Electrophoresis diagram of ISSR analysis of the *E. tirucalli* L. strains using primer UBC835 (the digitals are the codes of the strains)

表3 基于 ISSR 数据计算的 12 份供试品系之间的相似系数

Table 3 The genetic similarity of 12 *E. tirucalli* L. strains based on ISSR analysis

编号 Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.00											
2	0.80	1.00										
3	0.81	0.87	1.00									
4	0.80	0.88	0.89	1.00								
5	0.85	0.91	0.89	0.95	1.00							
6	0.86	0.85	0.93	0.87	0.92	1.00						
7	0.82	0.88	0.87	0.95	0.93	0.87	1.00					
8	0.76	0.85	0.84	0.89	0.89	0.84	0.87	1.00				
9	0.87	0.88	0.85	0.88	0.93	0.89	0.91	0.85	1.00			
10	0.58	0.54	0.53	0.59	0.59	0.53	0.61	0.58	0.59	1.00		
11	0.88	0.82	0.86	0.85	0.87	0.88	0.89	0.79	0.94	0.60	1.00	
12	0.87	0.86	0.85	0.86	0.91	0.89	0.88	0.82	0.98	0.59	0.94	1.00

各品系的聚类图(图2)可以看出,12份绿玉树品系可明显分为2个类群。第Ⅰ类群仅包含1个品系,即云南绿玉树,其他11份品系同属第Ⅱ类群。以相似系数0.89为准线时,第Ⅱ类群又可分为3个亚类群和2个单一品系,第Ⅰ亚类群包含4个吴川

2.2 聚类分析

各品系间的相似系数见表3。从表3可以看出,12份绿玉树品系的遗传相似系数在0.53~0.98之间,其中,海南和南亚所之间的遗传相似系数最高,为0.98;吴川3和云南之间及吴川6和云南之间的遗传相似系数皆最低,为0.53。6个吴川品系间,吴川4和吴川5及吴川4和吴川7之间的遗传相似系数最高,为0.95;吴川2和吴川6之间的遗传相似系数最低,为0.85。由以上分析可知,6个吴川品系间存在一定的差异,且遗传相似系数均低于海南和南亚所品系间的遗传相似系数,产生该现象的原因可能与绿玉树为异交植物有关。

品系:吴川2、吴川4、吴川5、吴川7;第Ⅱ亚类群包含2个吴川品系:吴川3、吴川6;第Ⅲ亚类群包含海南、南亚所、上海3个品系;2份单一品系分别为霞山绿玉树和坡头绿玉树。

3 讨论

本试验通过利用 ISSR 分子标记技术对 12 份绿玉树品系进行亲缘关系分析得知,我国绿玉树品系间有较大遗传差异,这种差异不仅存在于来自不同地区的品系间,而且存在于来自同一地区的品系间,如吴川绿玉树。

无性繁殖的绿玉树品系间存在丰富的遗传多样性,在图2的聚类中,霞山和坡头的绿玉树比包含海南、南亚所、上海的第Ⅲ亚类群与吴川的遗传距离还要远,而霞山、坡头和吴川同属湛江地区。根据调查,我国华南沿海至少是在80年前引入绿玉树的。目前在华南沿海发现的绿玉树母树都分布在海边,推测绿玉树可能是因其可以入药而被船员由原产地

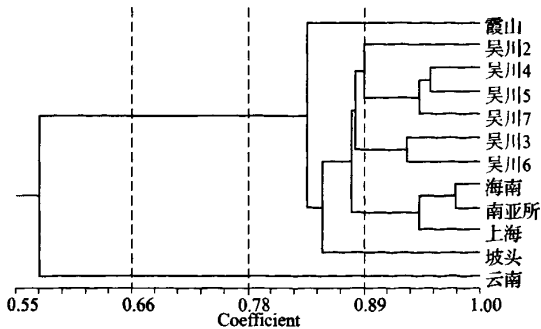


图2 12份绿玉树品系基于ISSR分析的UPGMA聚类图  
Fig.2 Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on ISSR analysis method among 12 *E. tirucalli* L. strains

带到船上,船到岸以后,船员便把它们丢在海边,其中极少数在海边生根。由于商船由绿玉树原产地非洲等地至华南沿海之间的往返是重复进行的,因此绿玉树枝条也有可能被重复带至。由于绿玉树在原产地主要为种子繁殖,具有丰富的遗传多样性。来自同一地区的绿玉树其原产地可能不同,可能存在较大的遗传差异,而来自不同地区的绿玉树其原产地可能相同,遗传差异较小。如上海植物园的绿玉树引自华南,具有与华南绿玉树相同的遗传多样性特点。

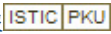
#### 参考文献

- [1] 蒋丽娟. 引进植物绿玉树 (*Euphorbia tirucalli* L.) 的繁殖技术及提高抗寒性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002
- [2] Maugh T H. The petroleum plant; Perhaps we can grow gasoline [J]. Science, 1976, 194: 46
- [3] Calvin M. Hydrocarbons from plants: Analytical methods and observations [J]. Naturwissenschaften, 1980, 67: 525-533
- [4] Sow D, Ollivier B, Viaund P, et al. Mesophilic and thermophilic methane fermentation of *Euphorbia tirucalli* [J]. MIRCEN Journal, 1989, 5: 547-550
- [5] Kalita D. Hydrocarbon plant—New source of energy for future [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2008, 12: 455-471
- [6] 李凌, 李政. 绿玉树分布状况的调查研究 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2005, 27 (5): 644-647
- [7] 刘万勃, 宋明, 刘富中, 等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10 (3): 231-236
- [8] 杨庆文, 张万霞, 时津霞, 等. 广东高州普通野生稻 *Oryza rufipogon* Griff. 的遗传多样性和居群遗传分化研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5 (4): 315-319
- [9] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6 (2): 172-177
- [10] 马艳明, 李斯深, 范玉顶, 等. 黄淮麦区小麦品种 (系) 的 ISSR 位点遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7 (1): 13-17
- [11] 赵丽娟, 张宗文, 黎裕, 等. 苦芥种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7 (2): 159-164
- [12] 孙群, 佟汉文, 吴波, 等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (1): 56-63
- [13] 高山, 许端祥, 林碧英, 等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (4): 396-400
- [14] 杜黎明, 毛伟海, 包崇来, 等. 茄子基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 反应体系优化 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15 (4): 723-724
- [15] 赵杨, 陈晓阳, 王秀荣, 等. 二色胡枝子遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (2): 195-199
- [16] 黄玮, 孙平, 张文生, 等. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 453-457
- [17] 刘本英, 王丽鸾, 周健, 等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 458-464
- [18] 孙芳, 杨敏生, 张军, 等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10 (1): 91-96
- [5] 王迎, 李大辉, 张英涛. 鼠尾草属药用植物及其近缘种的 ITS 序列分析 [J]. 药学报, 2007, 42 (12): 1309-1313
- [6] 王冰, 张勇, 陈成彬, 等. 中国不同地理居群丹参遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (19): 2000-2003
- [7] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (5): 4407-4414
- [8] Bruna S, Giovannini A, De Benedetti L, et al. Molecular analysis of *Salvia* of spp. through RAPD markers [C]. International Symposium on the Labiatae, Italy, 2006
- [9] Echeverrigaray S, Agostini G. Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers [J]. Revista brasileira de medicina, 2006, 8: 13-17
- [10] 郭宝林, 林生, 冯毓秀, 等. 丹参主要居群的遗传关系及药材道地性的初步研究 [J]. 中草药, 2003, 33 (12): 1113-1116
- [11] Walker J B, Sytsma K J. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the Staminal Leve [J]. Annals of Botany, 2007, 100: 375-391
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4325

(上接第 486 页)

作者: [黄文霞](#), [何仪](#), [何觉民](#), [莫俊杰](#), [陆建农](#), [刘召亮](#), [周鸿凯](#), [HUANG Wen-xia](#), [HE Yi](#), [HE Jue-min](#), [MO Jun-jie](#), [LU Jian-nong](#), [LIU Zhao-liang](#), [ZHOU Hong-kai](#)

作者单位: [广东海洋大学农业生物技术研究所, 湛江, 524088](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11(4)

## 参考文献(18条)

1. [刘本英;王丽鸳;周健](#) [云南大叶种茶树种质资源ISSR指纹图谱构建及遗传多样性分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(04)
2. [黄玮;孙平;张文生](#) [北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(04)
3. [赵杨;陈晓阳;壬秀荣](#) [二色胡枝子遗传多样性ISSR分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2007(02)
4. [蒋丽娟](#) [引进植物绿玉树\(Euphorbia tirucalli L.\)的繁殖技术及提高抗寒性的研究](#) 2002
5. [程春明;石云素;宋燕春](#) [ISSR分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2005(02)
6. [杨庆文;张万霞;时津霞](#) [广东高州普通野生稻Oryza rufipogon Griff.的遗传多样性和居群遗传分化研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2004(04)
7. [刘万勃;宋明;刘富中](#) [RAPD和ISSR标记对甜瓜种质遗传多样性的研究](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#) 2002(03)
8. [李凌;李政](#) [绿玉树分布状况的调查研究](#)[期刊论文]-[西南农业大学学报\(自然科学版\)](#) 2005(05)
9. [Kalita D](#) [Hydrocarbon plant-New source of energy for future](#) 2008
10. [Sow D;Ollivier B;Viaund P](#) [Mesophilic and thermophilic methane fermentation of Euphorbia tirucalli](#) [外文期刊] 1989
11. [Calvin M](#) [Hydrocarbons from plants:Analytical methods and observations](#) 1980
12. [Maugh T H](#) [The petroleum plant:Perhaps we can grow gasoline](#)[外文期刊] 1976
13. [孙芳;杨敏生;张军](#) [刺槐不同居群遗传多样性的ISSR分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2009(01)
14. [杜黎明;毛伟海;包崇来](#) [茄子基因组DNA提取及ISSR-PCR反应体系优化](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#) 2007(04)
15. [高山;许端祥;林碧英](#) [38份瓠瓜种质资源遗传多样性的ISSR分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2007(04)
16. [孙群;佟汉文;吴波](#) [不同种源乌拉尔甘草形态和ISSR遗传多样性研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2007(01)
17. [赵丽娟;张宗文;黎裕](#) [苦荞种质资源遗传多样性的ISSR分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2006(02)
18. [马艳明;李斯深;范玉顶](#) [黄淮麦区小麦品种\(系\)的ISSR位点遗传多样性分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2006(01)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201004019.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201004019.aspx)