

# 不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析

魏玉杰<sup>1,2</sup> 张金文<sup>1</sup> 何庆祥<sup>2</sup> 陈永坤<sup>3</sup> 陈凌娜<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 甘肃农业大学 兰州 730070; <sup>2</sup> 甘肃省农垦农业研究院 武威 733006;

<sup>3</sup> 甘肃亚盛集团博士后科研工作站 北京 100101)

**摘要:** 为了揭示罂粟种质的遗传多样性, 利用 ISSR 分子标记进行遗传多样性研究, 从 100 条随机引物中筛选出 9 条多态性引物对所有样品扩增, 共检测到 109 个等位变异位点, 引物等位位点数在 9~16 之间, 平均每条引物有 12 个等位变异, 其中, 引物 807 的等位位点最多, 为 16 个。引物等位位点多态性信息量 *PIC* 值为 0.77~0.92。其中引物 807 的 *PIC* 值最大 (0.92), 引物 847 的 *PIC* 值最小 (0.77)。遗传相似系数在 -0.452~0.981 之间, 且明显聚为 2 个类群; 亲缘关系和地理分布呈一定的相关性, 但没有形成明显的地理变异模式; 本研究将为罂粟种质资源科学有效利用提供理论依据。

**关键词:** 罂粟; ISSR; 遗传多样性

## ISSR Genetic Diversity of Opium Poppy Germplasms in Different Ecological Zones

WEI Yu-jie<sup>1,2</sup> ZHANG Jin-wen<sup>1</sup> HE Qing-xiang<sup>2</sup> CHEN Yong-kun<sup>3</sup> CHEN Ling-na<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Gansu Agricultural University Lanzhou 730070; <sup>2</sup> Gansu State Farms Academy of Agricultural Researches ,

Wuwei 733006; <sup>3</sup> Postdoctoral Scientific Research Station of Gansu Yasheng Group Beijing 100101)

**Abstract:** In order to reveal the genetic diversity of opium poppy in different ecological zones, based on the molecular markers of 100 inter-simple sequence repeat (ISSR), poppy and relatives from 12 different areas were amplified and analyzed with optimizing conditions for the primers. The results showed that a total of 109 allelic variations were detected between 9 and 16 loci for each primer. Among them, primer 807 had the most alleles of 16. The value of allelic polymorphism information content (*PIC*) ranged from 0.77 to 0.92, which the Maximum is 807 (0.92) and the minimum is 847 (0.77). Genetic similarity among them ranged from -0.452 to 0.981, and these 12 germplasms were classified into 2 groups. The poppy germplasms sources was less correlated with geographic latitude. There was no evident geographic patterns of the poppy germplasm sources happened. The research will provide basis theoretical for scientific and effective utilization poppy germplasms.

**Key words:** Opium poppy; ISSR; Genetic diversity

罂粟 (*Papaver somniferum* L.) 为 1 年生药用草本植物<sup>[1]</sup>, 是重要的药源植物<sup>[2]</sup>, 主要用于麻醉和镇痛药物吗啡和可待因的生产<sup>[3]</sup>。吗啡类生物碱因其成瘾性和依赖性而对社会有极大的危害, 国家控制种植, 故国内对其相关研究较少。在有些罂粟种质资源细胞中含有蒂巴因 (Thebaine), 它是一种异喹啉生物碱, 止痛效果同吗啡, 但由其合成的止痛

药物毒作用低, 种植也比较安全。对不同生态区的罂粟种质资源进行遗传结构比较研究有助于揭示遗传变异及其演化的内在原因, 并为选育非成瘾性的罂粟品种提供理论依据。

简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 分子标记是近年来应用较为广泛的分子标记技术<sup>[4]</sup>, 用微卫星锚定引物退火至 SSR (simple

收稿日期: 2010-11-15 修回日期: 2011-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160303)

作者简介: 魏玉杰, 副研究员, 在读博士, 主要从事特用植物生物技术育种研究。E-mail: gswwwwj67@163.com

通讯作者: 张金文, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物遗传育种研究。E-mail: jwzhang305@163.com

sequence repeat) 区域<sup>[5-7]</sup>,扩增出 SSR 毗连区域。它在发掘基因多态性方面非常有用<sup>[8]</sup>,同时又克服了 RFLP 技术局限性<sup>[9]</sup>和 RAPD 的假阳性<sup>[10]</sup>,所以 ISSR 分子标记被看作为一种较新的基因标记,比 AFLP 具有更高的多态性比率,更能提示遗传材料间多样性。其具有实验操作简单、快速和高效,遗传多态性高,重复性好,且无需知道基因组序列信息以及耗资少等特点,在植物分类与进化、遗传多样性分析以及遗传图谱构建和基因定位等方面均有广泛的应用<sup>[11-15]</sup>。近年来,国内外许多学者利用 ISSR 分析技术对植物亲缘关系进行研究<sup>[16-18]</sup>,刘小莉等<sup>[19]</sup>对报春花属 10 个种的种间变异进行了 ISSR 分析,并将这 10 个种聚为三大类。于恒秀等<sup>[20]</sup>利用 ISSR 引物鉴定芍药栽培品种间的亲缘关系。Varela 等<sup>[21]</sup>利用 ISSR 分子标记研究了草莓的遗传距离,程春明等<sup>[22]</sup>用 ISSR 分子标记技术分析了玉米自交系遗传关系。罂粟属异花授粉植物,虫媒花,花粉量较大,在自然界中容易引起变异产生新的物种。目前国内还没有关于罂粟 ISSR 遗传分析研究的报道。为此,本试验以不同生态区罂粟种质为材料,利用 ISSR 分子标记技术分析罂粟的遗传相似性,将为罂粟种质资源科学有效利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验所选用的植物材料共 12 份(表 1)。

表 1 试验材料

Table 1 List of the experimental materials

编号 No.	库编号 Code	来源 Source
1	NSP-01	宁夏石嘴山 Shizuishan ,Ningxia
2	XSP-02	新疆石河子 Shihezi ,Xinjiang
3	HHP-03	黑龙江哈尔滨 Harbin ,Heilongjiang
4	LCP-04	内蒙古赤峰 Chifeng ,Inner Mongolia
5	GHP-05	甘肃会宁 Huining ,Gansu
6	GNP-06	甘肃临夏 Linxia ,Gansu
7	GJP-07	甘肃酒泉 Jiuquan ,Gansu
8	GYP-08	甘肃靖远 Jingyuan ,Gansu
9	GSP-09	甘肃山丹 Shandan ,Gansu
10	GDP-10	甘肃定西 Dingxi ,Gansu
11	GTP-11	甘肃景泰 Jingtai ,Gansu
12	GWP-12	甘肃武威 Wuwei ,Gansu

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取方法 从提供的 12 份材料的种子中各随机取 100 粒,播于经过灭菌消毒的苗床,置于 22℃ 人工气候箱中发芽生长,于 3 周后每种材料各随机选取 5 株,采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[23]</sup>进行罂粟幼嫩叶片基因组 DNA 的提取,使用常规 CTAB 法<sup>[24]</sup>进行 DNA 的纯化。利用紫外分光光度计测定所提取 DNA 浓度,将 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.5~2.0 之间的 DNA 用于 ISSR 分析。

1.2.2 ISSR-PCR 条件优化 参照英属加拿大哥伦比亚大学 University of British Columbia (UBC) 2006 年公布的 ISSR 引物序列和 Kantety 等<sup>[25]</sup>研究所利用的 ISSR 引物序列,由上海生工生物工程有限公司合成引物。ISSR 的 PCR 反应总体积为 20μl,其中模板 DNA(100ng/μl) 1.5μl,引物(10μmol/L) 2.0μl,10×PCR 缓冲液 2.0μl,dNTP(2.5mmol/L) 2.0μl,Taq 酶(5U/μl) 0.3μl,ddH<sub>2</sub>O 12.2μl。10×PCR 缓冲液、Taq 酶、dNTP 均购自大连宝生物工程有限公司。ISSR 反应程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 1min;退火 1min,退火温度据引物而定;72℃ 延伸 2min;2~4 步骤循环 45 次;72℃ 延伸 5min;4℃ 下保存。对扩增条带多且清晰的引物进行进一步的条件优化。最后确定 9 条引物对所有样品用 Biometra PCR 仪进行扩增。表 2 列出了本试验所使用的 9 条引物的序列及退火温度。

表 2 ISSR 引物序列及其 PCR 退火温度和扩增产物多态性分析  
Table 2 ISSR primers and their PCR annealing temperatures and analytical polymorphisms of amplifications

引物编号 Code of Primers	引物序列 primer sequence	退火温度 Annealing temp(℃)	等位变异数 No. of Alleles	多态性 信息量 PIC
807	(AG) <sub>8</sub> T	52.8	16	0.92
808	(AG) <sub>8</sub> C	54.2	11	0.86
812	(GA) <sub>8</sub> A	49.9	10	0.85
813	(CT) <sub>8</sub> T	51.5	14	0.90
826	(AC) <sub>8</sub> C	52.8	14	0.90
842	(GA) <sub>8</sub> YG	42.8	13	0.87
844	(CT) <sub>8</sub> RC	52.8	10	0.84
847	(CA) <sub>8</sub> RC	52.8	9	0.77
886	(CA) <sub>8</sub> RG	49.9	12	0.87
合计 Total			109	
平均 Mean			12	0.86

**1.2.3 电泳及检测** 扩增产物在含有 Enrichment Broth(EB) 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测,电压 100V 20min,并以 100 ~ 2000bp 标准分子质量进行对照。

**1.2.4 ISSR-PCR 数据分析** 电泳图片通过 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件分析。首先对图片进行自动扫描,获取条带后再进行手工校正,然后将条带图像转换成匹配图,将 ISSR 电泳图谱清晰且可重复的条带赋值为 1,同一位置上的弱带且不重复或未出现带的赋值为 0。应用 SPSS11.5 软件分析数据,建立遗传 Jaccard 相似系数矩阵,建立相似度对比图,构建聚类图。标记多态性采用通用的多态性信息量  $PIC$  (Polymorphism Information Content) 衡量。 $PIC$  值依据 Anderson 等<sup>[26]</sup> 方法计算, $PIC$  值计算公式为:  $PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$  其中:  $P_{ij}$  表示标记  $i$  的第  $j$  个带型出现的频率,标记  $i$  的总带型从 1 到  $n$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR 标记的多态性分析

从加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条 ISSR 引物序列中随机选取 50 条对 12 个居群材料进行筛选,最后筛选出 9 条条带清晰、多态性丰富的引物用于罂粟种质的 ISSR-PCR 扩增。从表 2 中可知:9 条引物中 (AG) $_n$ 、(GA) $_n$ 、(CT) $_n$ 、(CA) $_n$  有 2 条, (AC) $_n$  有 1 条。共检测到 109 个等位变异位点,引物等位位点数在 9 ~ 16 之间,平均每条引物出现 12 个等位变异。引物 807 的等位位点最多,为 16 个。引物等位位点多态性信息量  $PIC$  值为 0.77 ~ 0.92。其中引物 807 的  $PIC$  值最大(0.92),引物 847 的  $PIC$  值最小(0.77),平均  $PIC$  值为 0.86(表 2),位点多态性信息含量与等位变异数基本一致。9 条所选适宜引物的 PCR 扩增图谱见图 1,箭头所指为等位位点变异的条带。

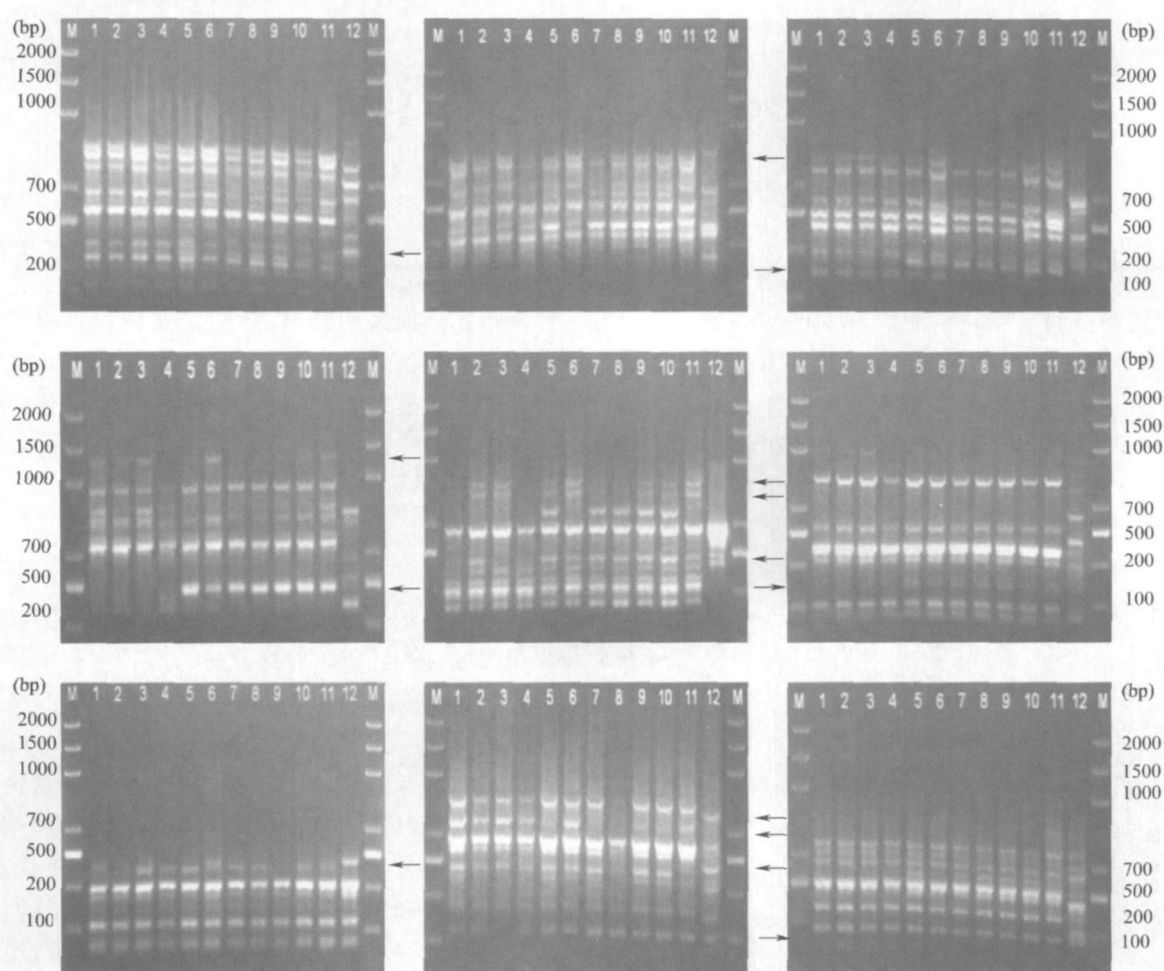


图 1 ISSR 9 条引物对 12 个罂粟种质扩增结果

Fig.1 The profiles of 12 poppy germplasm using the ISSR 9 primer

M 为 DNA Marker; 1 - 12 为供试样品; Lane "M" represents DNA marker, 1 - 12 represents sample

2.2 相似度分析

应用 SPSS11.5 统计分析软件,以夹角余弦法对 12 份样品进行相似性分析,各个体间的相似系数见表 3。从表 3 中可以看出,12 份罂粟材料的遗传相似系数在  $-0.452 \sim 0.981$  之间,其中甘肃武威与其他地区的罂粟种质个体之间存在负相似系数 ( $-0.323 \sim -0.452$ ),说明甘肃武威与其他地区的

罂粟种质个体之间有较大差异,亲缘关系相对较远;甘肃景泰与其他地区(除甘肃武威外)的罂粟种质个体之间遗传相似系数相对较低( $0.632 \sim 0.762$ ),宁夏石嘴山、新疆石河子、黑龙江哈尔滨、内蒙古赤峰罂粟种质个体遗传相似系数大于  $0.865(0.865 \sim 0.942)$ 。甘肃会宁、酒泉、靖远、山丹、定西之间罂粟种质个体遗传相似系数大于  $0.962(0.962 \sim 0.981)$  之间)。

表 3 基于 ISSR 数据计算的 12 份材料之间的相似系数

Table 3 The genetic similarity of 12 materials based on ISSR analysis

编号 Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****											
2	0.942	****										
3	0.865	0.923	****									
4	0.945	0.927	0.850	****								
5	0.788	0.806	0.767	0.776	****							
6	0.789	0.846	0.846	0.779	0.842	****						
7	0.769	0.787	0.748	0.766	0.981	0.824	****					
8	0.750	0.768	0.729	0.698	0.923	0.806	0.942	****				
9	0.787	0.806	0.771	0.737	0.964	0.842	0.981	0.962	****			
10	0.785	0.805	0.767	0.741	0.961	0.836	0.979	0.957	0.981	****		
11	0.632	0.688	0.688	0.626	0.722	0.757	0.745	0.728	0.762	0.762	****	
12	-0.319	-0.342	-0.380	-0.287	-0.352	-0.323	-0.366	-0.342	-0.387	-0.390	-0.452	****

2.3 聚类分析

以 12 份样品的 9 条引物分析结果进行遗传相似系数层次聚类,如图 2 所示,12 份样品共聚为 2 类,甘肃武威的分为 I 类,其他地区的分为 II 类,其中甘肃会宁、酒泉、靖远、山丹、定西、临夏聚为 1 个类群,在此类群中,临夏的又独立成为 1 个分支出现,其他地区的罂粟种质遗传距离较近( $\geq 0.92$ );宁夏石嘴山、新疆石河子、黑龙江哈尔滨、内蒙古赤峰聚成 1 个类群,表现较高的亲缘性;甘肃景泰作为独立的分支。由以上遗传相似系数聚类分析可知,

甘肃除武威地区的以外,其他罂粟种质具有一定的遗传相似性;而甘肃与宁夏、新疆、黑龙江、内蒙古的罂粟种质虽然具有一定的亲缘关系,但个体间仍存在一定的差异性。

3 讨论

黄光文等<sup>[27]</sup>认为 ISSR 相对其他 DNA 分子标记技术而言是一种较理想的水稻分子指纹方法。王金花等<sup>[28]</sup>利用 ISSR 引物获得的品种间遗传相似系数范围为  $0.595 \sim 0.867$ ,与田间试验获得的高相似性结果类似。黄文霞等<sup>[29]</sup>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,发现我国绿玉树种质间存在丰富的遗传变异。这说明 ISSR 用于植物的遗传多样性分析是可行而有效的。

本试验利用 ISSR 分子标记技术对不同生态区的 12 份罂粟种质资源进行遗传多样性研究,结果表明,我国不同生态区的罂粟种质具有相近的遗传关系,同一生态区内各种质间的差异较小,表现出较高的亲缘关系;但来源于甘肃各地区的罂粟种质中,武

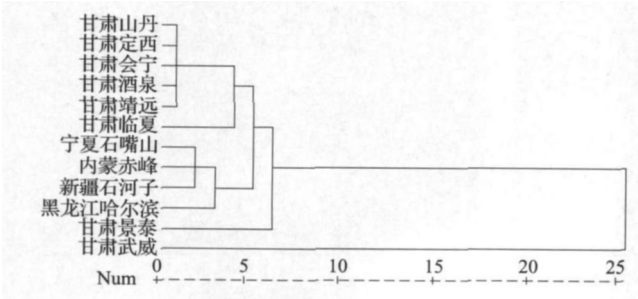


图 2 12 份样品的遗传相似系数聚类图

Fig. 2 Dendrogram of genetic similarity coefficient

威与其他生态型的差异最大,经表型鉴定该种质与其他罂粟种质可能不属于同一种,表现为武威的罂粟种质首先在种子大小、形状和颜色上与其他不同,其罂粟种质种子千粒重  $0.37 \sim 0.39\text{g}$ ,种子呈肾型,表面光滑,颜色呈铁锈红;而其他生态型的种子大小  $0.41 \sim 0.45\text{g}$ ,种子呈椭圆形,表面有网纹,颜色呈紫色、白色、奶油色不等。ISSR 标记分析显示武威的罂粟种质与其他生态型的相似性系数为负,表明遗传亲缘关系较远,说明该种质与其他生态区的罂粟种质不属于同种,验证了表型鉴定结果。在今后的研究中将进一步通过种植进行表型鉴定,确定两者之间的遗传亲缘关系;甘肃景泰与甘肃其他地区(除武威)的罂粟种质的遗传距离相对较远,可能此种质的原产地不在景泰,而存在略大的遗传差异;甘肃(除武威)各地区的罂粟种质虽与宁夏等地的罂粟种质具有相近的遗传亲缘关系,9 条引物扩增的位点数和位点多态性信息含量整齐度相对较好;而在第 II 类中,甘肃临夏的罂粟种质独立成为一个分支,这可能与本地区罂粟的栽培历史等有关,将在后续研究中加以更深入的探讨。

通过表型性状、分子标记数据基本能将不同来源的材料区分开。但表型性状作为材料鉴别分析的方法,更为直观、更能突出作物的地域特征。而分子标记技术不受外界环境的影响,可以弥补农艺性状数据有限的缺陷,更为精确、稳定地鉴定材料之间的同异性<sup>[30]</sup>。本文只从分子方面进行了遗传关系鉴定和分类,为了进一步明确不同生态型罂粟种质资源的遗传多样性,将结合农艺性状等表型,将不同类群间遗传相似性较小的材料作为亲本,确定育种目标,这样可减少研究材料的数量,提高育种效率。特别是独立成群的少部分材料,与其他材料间表现出较大的遗传差异,具有很大的利用潜力,可重点进行保存利用研究。

#### 参考文献

- [1] 王淑敏. 罂粟、古柯和大麻[J]. 生物学通报, 2000, 35(3): 22-23
- [2] Hari S A, Vimals. Molecular characterization of opium poppy[J]. Am J Infect Dis, 1999, 5(2): 155-160
- [3] Ye K, Ke Y, Keshava N, et al. Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells[J]. Proceed Nat Acad Sci(USA), 1998, 95(2): 1601-1606
- [4] 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] 马艳明, 范玉顶, 李斯深, 等. 黄淮麦区小麦品种(系)品质性状多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2): 133-138
- [6] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. Plant, 1993, 3(1): 175-182
- [7] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999, 15(4): 19-22
- [8] Rafalski J A, Tingey S V, Williams G K. RAPD markers—a new technology for genetic mapping and plant breeding[J]. Agric Biotechno News Inform, 1991, 3: 645-648
- [9] Devos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[J]. Theor Appl Genet, 1992, 84(5-6): 567-572
- [10] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 68-189
- [11] 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
- [12] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616
- [13] Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17
- [14] Li J M, Jin Z X. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation[J]. Genetica, 2008, 133(3): 227-234
- [15] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95(3): 408-417
- [16] 赵谦, 杜虹, 庄东红, 等. 14 个蝴蝶兰品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2008, 28(2): 227-231
- [17] 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
- [18] Rajesh P N, Sant V J, Gupta V S, et al. Genetic relationships among annual and perennial wild species of *Cicer* using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism[J]. Euphytica, 2002, 129(1): 15-23
- [19] 刘小莉, 刘飞虎, 李宗菊, 等. 10 种报春花亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2004, 26(5): 454-458
- [20] 于恒秀, 王森, 梁国华, 等. ISSR 引物鉴定芍药栽培品种之间亲缘关系的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 271-274
- [21] Varela M A, González-Tizón A, Mariñas L, et al. Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus* mussels[J]. Biochem Genet, 2007, 45(7-8): 565-578
- [22] 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
- [23] 程丽莉, 苏淑钗, 秦岭, 等. 板栗叶片 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 北京农学院学报, 2005, 20(2): 5-9
- [24] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 461-469
- [25] Kantety R V, Zeng X, Bennetzen J L, et al. Detection of high levels of polymorphism among dent and popcorn inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification technique[J]. Maize Genet Cooper Newsl, 1995, 69: 132-134
- [26] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps[J]. Genome, 1993, 36(1): 181-186
- [27] 黄光文, 陈觉梁, 王伟成, 等. 运用 ISSR 标记鉴别水稻品种的初步研究[J]. 杂交水稻, 2006, 21(3): 64-67
- [28] 王金花, 罗文永, 陈建伟, 等. 应用 SSR 和 ISSR 标记分析栽培香稻品种的遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 37-42
- [29] 黄文霞, 何仪, 何觉民, 等. 高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 487-490
- [30] 耿立格, 王丽娜, 张磊, 等. 河北省绿豆叶黑豆种质资源表现型和 ISSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 266-270