

基于 ISSR 的甘肃中麻黄遗传多样性研究

朱田田^{1,3,4}, 晋玲^{1,2,3*}, 杜弢^{1,4}, 崔治家^{1,3}, 张弦飞¹, 张延红^{1,4}

1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省高校中(藏)药化学质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃中医学院中(藏)药资源研究所, 甘肃 兰州 730000

4. 甘肃中医学院药用植物遗传育种研究所, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 研究甘肃不同居群中麻黄 *Ephedra intermedia* 的遗传多样性。**方法** 应用 ISSR 分子标记技术对甘肃省 11 个居群的中麻黄样本进行分析, 利用 POPGENE 32 软件分析 Nei's 基因多样性指数 (H) 等遗传信息参数, 应用 NTSYS 软件构建亲缘关系 UPGMA 聚类图。**结果** 12 条引物共检测到 175 个位点, 其中多态性位点 150 个, 多态位点百分率 (PPL) 为 85.71%。中麻黄居群间的 H 为 0.211 4, Shannon's 多样性信息指数 (I) 为 0.332 1, 种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.259 3, 基因流 (N_m) 为 1.428 6, 遗传距离 0.014 4~0.159 8。**结论** 甘肃中麻黄种群遗传多样性水平较高, 但居群内遗传多样性水平低于居群间; 中麻黄种群的遗传变异主要存在于居群内; 亲缘关系与地理分布具有一定的相关性。

关键词: 甘肃; 中麻黄; ISSR; 遗传多样性; 分子标记技术

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1764-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.022

Genetic diversity analysis on *Ephedra intermedia* from Gansu based on ISSR

ZHU Tian-tian^{1,3,4}, JIN Ling^{1,2,3}, DU Tao^{1,4}, CUI Zhi-jia^{1,3}, ZHANG Xian-fei¹, ZHANG Yan-hong^{1,4}

1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of College of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

3. Research Institute of Medicinal Plant Genetic Breeding, Lanzhou 730000, China

4. Centre of Urban Ecology and Environmental Biotechnology, Lanzhou City University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of *Ephedra intermedia* from different populations in Gansu. **Methods** ISSR markers were used to analyze the genetic diversity of 11 populations of *E. intermedia*. Nei's genetic diversity index (H) and other parameters of genetic information were calculated by POPGEN 32. UPGMA relationship dendrogram was clustered by NTSYS. **Results** Twelve primers produced 185 bands, among which 150 were polymorphic bands, and the percentage of polymorphic loci (PPL) was 85.71%. H and Shannon's information index (I) were 0.211 4 and 0.332 1, and genetic differentiation coefficient (G_{st}) and gene flow (N_m) were 0.259 3 and 1.428 6 within the population levels. The genetic distance varied from 0.014 4 to 0.159 8. **Conclusion** The genetic diversity among the populations of *E. intermedia* is at higher level, but the level of genetic diversity within populations than between populations. Genetic variance of *E. intermedia* mainly exists among populations. The genetic distance of *E. intermedia* is associated with geographical distance.

Key words: Gansu province; *Ephedra intermedia* Schrenk ex Mey.; ISSR; genetic diversity; molecular marker

中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk ex Mey. 是 西北地区最为常见。生于海拔数百米至 2 000 多米的
麻黄科中麻黄属多年生小灌木植物, 主产于甘肃、 干旱地区, 沙漠地区以及干旱的山坡或草地上, 是
青海、陕西、新疆、河北、山东、内蒙等省区, 以 被《中国药典》2010 年收录的正品麻黄之一, 也是

收稿日期: 2013-12-23

基金项目: 科技基础性工作专项重点项目子课题(SB2007FY020); 甘肃教育厅科研项目(1106B-07); 甘肃中医学院中青年基金项目(ZQ2011-12)

作者简介: 朱田田(1983—), 女, 甘肃金昌人, 讲师, 硕士, 研究方向为中药资源开发与质量综合评价。Tel: 13088731903 E-mail: ztt0935@163.com

*通信作者 晋玲(1974—), 女, 陕西韩城人, 教授, 博士, 研究方向为珍稀濒危和大宗常用中药资源可持续利用。

Tel: (0931)8765304 E-mail: zyxyjl@163.com

甘肃省的主产药材之一^[1-2]。由于近年来滥采乱挖现象严重,致使中麻黄野生资源日渐枯竭,地面覆盖逐年减少,已成为濒危药用植物^[3]。因此,中麻黄资源的可持续性利用和保护工作势在必行。

近年来,DNA分子标记技术已在植物种质资源利用与保护方面得到广泛应用,并成为研究热点^[4-7]。简单重复序列区间(inter simple sequence repeat, ISSR)是由 Zietkiewicz 等于 1994 年发展的一种基于微卫星系列的新的分子标记技术,用于检测简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)间 DNA 序列差异,具有不需要知道序列信息、简便、快捷、重复性好等特点^[8]。因此,本研究利用 ISSR 分子标记技术对甘肃不同居群中麻黄品种进行遗传多样性分析,为中麻黄资源的合理开发、利用、保护和育种工作提供遗传学理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

材料为甘肃省不同居群中麻黄地上草质茎,采集信息见表 1,采样时选取无病虫害的幼嫩地上茎,放入装有硅胶的塑封袋中迅速干燥,并带回实验室于-20℃冰柜中保存。全部样品由甘肃中医学院中药资源教研室晋玲教授鉴定为麻黄科(Ephedraceae)中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk ex Mey. 的原植物。

表 1 植物材料信息

Table 1 Information of plant materials

编号	居群代码	采集地	样本数	类型
1	rss	甘肃省兰州市榆中县仁寿山	19	半野生
2	xls	甘肃省兰州市安宁区兴隆山	18	野生
3	jp	甘肃省酒泉市文殊镇	20	野生
4	zy	甘肃省张掖市高台县南华镇	9	野生
5	ym	甘肃省玉门市油区	20	野生
6	mq	甘肃省民勤沙生植物园	13	栽培
7	tgls	腾格里沙漠	20	野生
8	glyht	甘肃省古浪县洋湖塘镇	18	栽培
9	glhxx	甘肃省古浪县黄花乡	10	栽培
10	glhzt-y	甘肃省武威市古浪县海子滩镇	8	野生
11	glhzt-z	甘肃省武威市古浪县海子滩镇	8	栽培

1.2 仪器与试剂

凝胶成像系统(美国 Bio-Rad); PCR 扩增仪(德国 Biometra); 台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司 TGL16M 型); DYY—7 型电泳仪(北京六一仪器厂); 电泳槽(北京六一仪器厂)。

ISSR 随机引物(根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成); CTAB、EDTA、SDS、Tris、PVP、β-巯基乙醇(西安科昊生物工程有限责任公司); RNaseA、Agarose 琼脂糖、EB、TaqDNA 聚合酶, dNTPs, 10×缓冲液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取及检测

采用改良 CTAB 法^[9]提取不同居群中麻黄样本基因组 DNA,用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的完整性,适当稀释后保存于-20℃冰箱中备用。

2.2 ISSR-PCR 反应体系与扩增程序

反应总体积为 20 μL,内含 10×PCR 缓冲液(Mg²⁺ Plus) 2.0 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U,引物 0.4 μmol/L, dNTPs 0.25 mmol/L 以及 DNA 模板 30 ng。扩增程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 45 s,根据不同引物的退火温度复性 45 s,72℃延伸 2 min,40 个循环,72℃延伸 7 min,4℃保存结束反应。

2.3 供试样品电泳检测

用筛选出的 12 条 ISSR 引物^[10]按其最佳退火温度(表 2)逐条对 11 个不同居群样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应结束后进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为 1×TBE,电压 100 V 下电泳 90 min 左右,EB(10 mg/mL)染色 20 min,在凝胶成像系统下检测并拍照保存。

2.4 数据统计与分析

采用人工读带法,在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0,建立数据矩阵。利用 Popgen32 软件对数据资料进行遗传多样性统计,分析各居群多态位点百分率(PPL)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 多态性信息指数(I)、居群总基因多样性(H_T)、居群内基因多样性(H_S)、基因分化系数(G_{ST}),基因流(N_m)、Nei's 遗传一致度和遗传距离(D),并根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,应用 NTSYS 软件构建系统树状图。

表 2 不同引物 ISSR 引物最佳退火温度

Table 2 Optimal annealing temperature for PCR reaction by different ISSR primers

引物编号	引物序列 (5' to 3')	T_m 值 / °C	退火温度 / °C
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.00	54.8
UBC-825	ACACACACACACACT	50.00	50.4
UBC-826	ACACACACACACACC	52.00	55.5
UBC-827	ACACACACACACACG	52.00	57.7
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52.00~54.00	51.3
UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52.00~54.00	55.5
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	54.00~56.00	54.7
UBC-846	CACACACACACACART	52.00~54.00	50.4
UBC-848	CACACACACACACARG	54.00~56.00	54.8
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTC	60.00	59.3
UBC-885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	48.00~54.00	54.7
UBC-895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	58.00	60.7

R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T), H = (A, C, T)

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 扩增结果

用筛选出的 12 条 ISSR 引物对所有中麻黄基因组 DNA 进行扩增和电泳检测。结果显示, 大部分样本均能扩增出清晰、数量多的条带, 扩增产物碱基数在 200~2 000 bp。引物 UBC-866 和 UBC-895 对甘肃省兰州市安宁区兴隆山中麻黄居群 14 个样本的扩增图谱见图 1。

3.2 中麻黄遗传多样性分析

12 条引物对 11 个居群的 163 个个体进行了 ISSR 分析, 共检测到位点 175 个, 其中多态性位点 150 个, PPL 值为 85.71%, 说明中麻黄具有较高的遗传多样性。根据 Popgen 软件统计结果(表 3), 中麻黄居群间的 H 为 0.211 4, I 为 0.332 1, 而不同居群内的 PPL 在 21.14%~62.29%, 其中最高的是 *rss*; 最低的是 *glhzt-z*。 H 为 0.084 6~0.201 3, I 为 0.123 3~0.305 9, H 和 I 的大小与各 PPL 的高低趋势基本一致, 各项系数均是 *rss* 最高, *glhzt-y* 的栽培居群最低。此外, 由于居群间的 PPL、 H 和 I 均高于各居群内的值, 说明中麻黄的居群内的遗传多样性水平低于居群间。Wright 提出当基因流 $N_m > 1$ 时, 居群间存在一定的基因流, 其值越大基因交流越强^[11], 在中麻黄的 11 个居群中, N_m 值为 1.428 6, 表明不同中麻黄居群间存在一定基因流, 但水平不高。

3.3 中麻黄不同居群的遗传分化分析

通过 Popgen 软件分析得到中麻黄各居群的 H_t

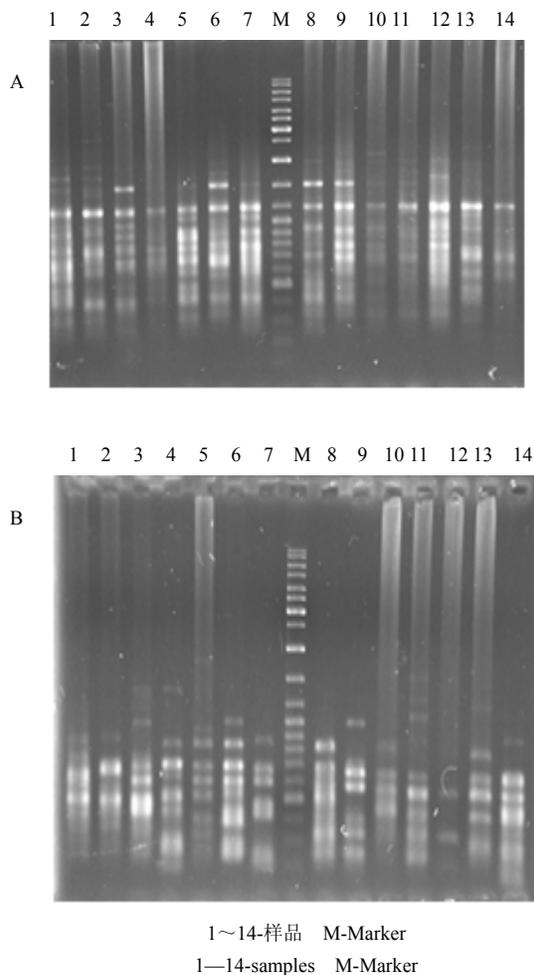


图 1 UBC-866 (A) 和 UBC-895 (B) 对 xls 居群部分样本的扩增结果

Fig. 1 Amplification of samples from xls population by UBC-866 (A) and UBC895 (B)

为 0.211 9, H_s 为 0.157 0, 根据 H_t 和 H_s 来计算 G_{st} 为 0.259 3。这表明有 25.93% 的变异存在于居群间, 而 74.07% 的变异存在于居群内。居群的遗传分化表明, 中麻黄居群间的分化程度较小, 但居群内部却具有高度的遗传分化。

3.4 中麻黄居群间遗传距离与聚类分析

Popgen 软件统计结果表明, 11 个不同居群中麻黄之间遗传距离的变异范围是 0.014 4~0.159 8 (表 4), 其中 mq 与 glhzt-z 之间的遗传距离最大, 为 0.159 8, 这也表明两者之间的亲缘关系最远。tglsm 和古 glyht 之间的遗传距离最近, 为 0.014 4, 说明二者之间亲缘关系最近。

为了进一步表明各居群间的亲缘关系, 利用 NTSYS 软件构建各居群 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚

类图, 通过聚类图可直接反映甘肃 11 个中麻黄居群间的亲缘关系。结果表明, 在遗传距离 0.12 处 glhzt-z 和 glhzt-y, 其他各居群归为另一类; 在遗传距离 0.055 处, 民勤沙生植物园栽培居群被单独聚为一类, 其余各居群归为一类; 在遗传距离 0.045 处, rss、xls 和 jp 的居群聚为一类, 其他各居群归为另一类; 在遗传距离 0.038 处, zy 和 ym 为一类, tglsm、glhxx 和 glhht 聚为一类, 亲缘关系与地理分布具有一定的相关性 (图 2)。

4 讨论

遗传多样性一般指种内的遗传差异水平, 它可以反映了一个物种适应环境的能力以及可被改造和利用的潜力^[12], 如果一个物种的遗传多样性水平降低, 就会导致其适应能力变差, 有害隐性基因表达

表 3 11 个不同居群中麻黄遗传信息参数

Table 3 Parameters of genetic information on 11 populations of *E. intermedia*

居群	样本个数	总位点数	多态性标记位点数	PPL / %	H	I
rss	19	175	109	62.29	0.201 3	0.305 9
xls	18	175	104	59.43	0.168 7	0.261 9
glhzt-z	8	175	37	21.14	0.084 6	0.123 3
glhzt-y	8	175	51	29.14	0.101 4	0.151 6
zy	9	175	96	54.86	0.177 8	0.270 6
jp	20	175	108	61.71	0.191 8	0.294 0
ym	20	175	101	57.71	0.191 2	0.288 2
mq	13	175	89	50.86	0.175 3	0.261 9
glhxx	10	175	73	41.71	0.125 9	0.195 5
tglsm	20	175	102	58.29	0.167 8	0.260 8
glyht	18	175	100	57.14	0.141 1	0.225 8
总计	163	175	150	85.71	0.211 4	0.332 1

表 4 中麻黄居群遗传距离和遗传一致度

Table 4 Genetic distance and genetic identity of *E. intermedia* populations

居群	rss	xls	jp	zy	ym	mq	tglsm	glyht	glhxx	glhzt-y	glhzt-z
rss	****	0.985 5	0.973 2	0.965 7	0.959 7	0.935 1	0.957 2	0.949 5	0.936 1	0.900 1	0.878 1
xls	0.014 6	****	0.984 2	0.952 9	0.957 6	0.945 7	0.959 9	0.946 4	0.932 5	0.898 0	0.864 2
jp	0.027 1	0.015 9	****	0.972 6	0.966 7	0.958 1	0.962 3	0.949 5	0.939 6	0.898 5	0.870 7
zy	0.034 9	0.048 2	0.027 8	****	0.984 8	0.950 7	0.969 7	0.963 6	0.955 7	0.905 8	0.885 9
ym	0.041 1	0.043 3	0.033 8	0.015 3	****	0.967 3	0.977 0	0.961 1	0.959 4	0.897 7	0.888 8
mq	0.067 1	0.055 8	0.042 8	0.050 6	0.033 3	****	0.960 9	0.928 5	0.923 3	0.864 7	0.852 3
tglsm	0.043 7	0.040 9	0.038 4	0.030 8	0.023 3	0.039 9	****	0.985 7	0.974 4	0.901 9	0.885 9
glyht	0.051 8	0.055 1	0.051 9	0.037 1	0.039 6	0.074 2	0.014 4	****	0.980 9	0.913 4	0.896 3
glhxx	0.066 0	0.069 8	0.062 3	0.045 3	0.041 5	0.079 8	0.025 9	0.019 3	****	0.896 7	0.890 9
glhzt-y	0.105 2	0.107 6	0.107 1	0.099 0	0.107 9	0.145 3	0.103 3	0.090 6	0.109 0	****	0.955 7
glhzt-z	0.130 0	0.145 9	0.138 4	0.121 1	0.117 9	0.159 8	0.121 1	0.109 4	0.115 5	0.045 3	****

Nei's 遗传一致度 (对角线以上), 遗传距离 (对角线以下)

Nei's genetic identity (above diagonal), and genetic distance (below diagonal)

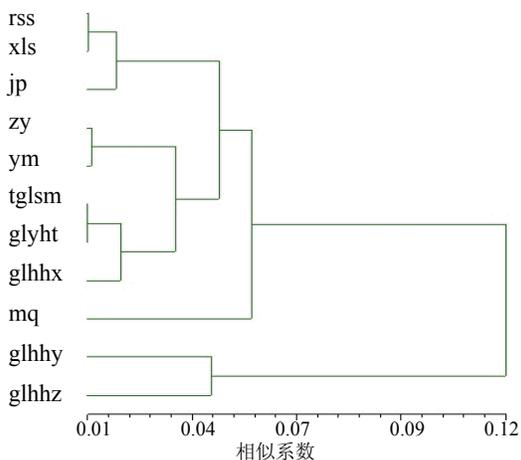


图 2 11 个居群中麻黄的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 11 populations of *E. intermedia*

增加, 最终会导致该物种的退化, 这对于稀有和濒危物种的生物多样性保护是十分不利的。本课题利用 12 条 ISSR 随机引物对甘肃 11 个不同居群的 163 个样本扩增后, 多态位点率为 85.71%, 比裸子植物的平均多态位点比率 70.9%^[13]高, 说明中麻黄在物种水平上具有较高的遗传多样性。Popgen32 软件统计结果表明居群内的 *H*、*I* 均比居群间的低, 说明中麻黄的遗传多样性主要来自于居群间, 因此在采取保护措施时应尽量保护数量多的居群。此外, 由于不同中麻黄居群间基因流水平不高, 导致居群内遗传多样性低, 为了防止居群内中麻黄种质退化, 应加强不同地区间中麻黄的基因交流。

根据基因分化系数估算的 11 个居群间的遗传分化系数为 0.259 3, 说明居群间的基因变异只占总的基因多样性的 25.93%, 居群内占 74.07%。这表明大量的遗传分化主要存在于中麻黄居群内, 少量的遗传分化存在于居群之间, 这与其在不同地区间基因流有关, 可以防止中麻黄居群内的近交衰退。此外, 由于中麻黄主要分布在干旱的荒漠、戈壁地区, 各居群生境类型简单, 使其受生态环境影响差异不大, 以至居群间的遗传分化程度较小。

许多研究表明, 亲缘关系远近与地理分布呈一定相关性^[14-15]。从聚类结果来看, 地理距离较近的古浪县洋湖塘镇居群和古浪黄花乡居群、古浪县海子滩镇野生居群和栽培居群、兰州仁寿山和兴隆山居群均被聚为一类, 充分表明了具有相同遗传背景

的中麻黄居群其地理距离越近, 亲缘关系也越近, 所以相距较远的地区中麻黄间的基因交流有阻碍性。但在聚为一支的酒泉市文殊镇居群和兰州兴隆山、仁寿山居群中, 前者却与后者的地理距离较远, 说明地理差异并不是决定亲缘关系远近的惟一因素, 其还受到繁育系统、生境条件和基因流多方面的影响, 中麻黄遗传多样性是由其基因多样性和环境因素共同决定的。

参考文献

[1] 中科院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[3] 魏建和, 李先恩, 高海泉, 等. 甘肃省甘草麻黄资源状况调查 [J]. 中药信息与研究, 2011, 36(9): 1129-1132.

[4] 高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 363-366.

[5] 张忠廉, 李学兰, 杨春勇, 等. 砂仁遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 570-574.

[6] 李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 等. 不同产地仙茅遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 967-971.

[7] 张忠廉, 李学兰, 张丽霞, 等. 叶下珠种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 159-162.

[8] 周延清. 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[9] 朱田田, 晋玲, 杜弢, 等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 40(4): 316-318.

[10] 朱田田, 晋玲, 杜弢, 等. 中麻黄 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 中国药房, 2013, 43(24): 4033-4037.

[11] 张春平, 何平, 何俊星, 等. ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2010, 41(11): 1881-1885.

[12] 王建波. 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] 魏利. 利用 ISSR 分子标记对西伯利亚红松 (*Pinus sibirica* Du Tour) 遗传多样性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.

[14] 任盘宇, 潘明清. 云南南部 5 种魔芋属植物居群遗传结构的 ISSR 分析 [J]. 武汉大学学报, 2013, 59(1): 99-104.

[15] 张春平, 何平, 胡世俊, 等. 黄连遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1630-1634.