

基于 CDDP 标记的重楼属种质资源鉴定及遗传多样性分析

周武先¹, 段媛媛¹, 卢超¹, 由金文¹, 何银生¹, 王智², 杨旭³, 尹晓蛟³, 程天周⁴, 安小玲⁵, 张美德^{1*}

1. 湖北省农业科学院中药材研究所 湖北省农业科技创新中心中药材分中心, 湖北 恩施 445000
2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
3. 湖北生态工程职业技术学院, 湖北 武汉 430200
4. 恩施程丰农业综合开发有限公司, 湖北 恩施 445000
5. 渭南市农业科学研究所, 陕西 渭南 714000

摘要: 目的 研究重楼属植物遗传多样性, 并为其种质资源的快速鉴定提供有效方法。方法 采用 CDDP 分子标记方法对 13 份不同的重楼种质资源的遗传多样性进行分析, 并按照 CODE128 条形码编码规则为重楼属植物进行编码。结果 11 条引物共扩增了 80 个条带, 其中多态性条带 73 个, 多态性比率 91.25%, 等位基因数 (N_a) 为 1.912 5, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.589 6, Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.342 3, Shannon 信息指数 (I) 为 0.507 0。UPGMA 聚类分析表明, 重楼属植物遗传多样性丰富。在 CDDP 分子标记的基础上依据 CODE128 条形码编码规则为重楼属植物构建了条形码分子身份证。结论 重楼属资源遗传多样性丰富, CDDP 分子标记可用于重楼属种质资源的鉴定及遗传多样性分析, 且构建的条形码分子身份证检测灵敏、快捷, 可用于相关科研工作和工业生产中重楼属植物的鉴定。

关键词: 重楼属; CDDP 标记; 种质资源; 遗传多样性; 条形码分子身份证

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-5033-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.027

Genetic diversity analysis and germplasm identification of *Paris* species by CDDP markers

ZHOU Wu-xian¹, DUAN Yuan-yuan¹, LU Chao¹, YOU Jin-wen¹, HE Yin-sheng¹, WANG Zhi², YANG Xu³, YIN Xiao-jiao³, CHENG Tian-zhou⁴, AN Xiao-ling⁵, ZHANG Mei-de¹

1. Chinese Medicinal materials Branch of Hubei Agriculture Technology Innovation Center, Institute of Chinese Herbal Medicine of Hubei Academy of Agriculture Sciences, Enshi 445000, China
2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Hubei Ecology Polytechnic College, Wuhan 430200, China
4. Enshi Chengfeng Agriculture Co., Ltd., Enshi 445000, China
5. Weinan Institute of Agriculture Sciences, Weinan 714000, China

Abstract: Objective To explore genetic diversity and phylogenetic relationship among different types of *Paris* species and provide an effective method for the rapid identification of germplasm resources. **Methods** CDDP marker was used to evaluate the genetic diversity and phylogenetic relationship among 13 types of *Paris* species. And the coding of *Paris* genus plants was carried out based on method of CODE128 barcode. **Results** Our results indicated that 73 polymorphic bands were amplified by 11 primers among 80 bands, and the ratio of polymorphic band was 91.25%. The observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (H), and Shannon's information index (I) was 1.912 5, 1.589 6, 0.342 3, and 0.507 0, respectively. The results of UPGMA analysis showed that there were great differences among 13 types of *Paris* species on genetic diversity. Based on CDDP markers, 13 barcode molecular identity cards were constructed for *Paris* species based on method of CODE128 barcode. **Conclusion** There

收稿日期: 2019-05-04

基金项目: 湖北省中央引导地方科技发展专项资金 (2018ZYDD013); 湖北省中央引导地方科技发展专项资金 (2019ZYDD064); 恩施州科技计划研究与开发项目 (D20180014); 湖北省农业科学院青年科学基金项目 (2019NKYJJ13)

作者简介: 周武先, 助理研究员, 研究方向为药用植物资源育种。Tel/Fax: (0718)8412341 E-mail: zhou_wx222@163.com

*通信作者 张美德, 副研究员, 研究方向为药用植物资源育种。Tel/Fax: (0718)8416543 E-mail: E-mail: toecho@163.com

was abundant polymorphism among *Paris* species, and CDDP markers were effective to analyze the genetic diversity of *Paris* species, and the established barcode molecular identity for *Paris* species was sensitive and fast, which can be used for scientific research and industrial production of *Paris* genus.

Key words: *Paris* L.; CDDP marker; germplasm resources; genetic diversity; barcode molecular identity

重楼属 *Paris* L. 植物是百合科 (Liliaceae) 多年生草本, 在我国约有 19 种 (不含变种), 主要分布在西南地区^[1]。重楼是一种中成药原料, 具有凉肝定惊、消肿止痛、清热解毒的功效^[2]。《中国药典》2015 年版仅收录了百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* Smith (Franch.) Hand. -Mazz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franchet) H. Hara 的干燥根茎^[2]。而重楼属植物外貌特征一致, 即均具有一轮叶、一个茎和顶生一枝花, 种间外部形态特征较为相似, 不容易区分^[3]。其繁殖率低, 种植周期长, 人工种植风险高^[4]。近年来, 市场需求旺盛, 重楼的价格随之暴涨, 供不应求^[5], 加之人们的过度采挖及生境破坏, 野生资源急剧减少^[6]。由于利益驱动, 多地出现了同属多种重楼掺混入药的现象, 导致商用药材基原混杂, 药材品质参差不齐, 因此, 亟待开发快速鉴定重楼属药材的有效方法。

CDDP (conserved DNA-derived polymorphism) 分子标记技术是依据植物中功能基因和基因家族的保守氨基酸序列设计引物, 实现快速鉴定不同物种的分子标记手段^[7]。由于 CDDP 是基于功能基因片段设计的引物, 因此扩增得到的标记片段可能是目的基因的一部分或与基因紧密连锁, 是一种显性标记, 具有良好的多态性, 在分子标记辅助育种、遗传多样性分析和种质资源鉴定等方面有重要的应用价值^[8-9]。目前 CDDP 分子标记技术已在其他药用植物的遗传多样性分析及种质资源鉴定等方面广泛应用^[10-11]。近年来, 由于重楼属植物的分子标记技术的研究主要有 SSR^[12-13]及 DNA 条形码技术^[14-15], 而关于 CDDP 分子标记方面的研究鲜有报道。本研究利用 CDDP 分子标记方法对 13 份不同重楼种质资源的遗传多样性进行分析, 并按照 CODE128 条形码编码规则为重楼属植物进行编码, 从分子水平上检测重楼属植物物种水平的亲缘关系, 为合理利用重楼属植物种质资源、鉴定商用重楼基原种提供技术指导, 同时为重楼属药材的安全和品质提供有效保障。

1 材料

本实验使用的 13 份重楼属植物资源均采集自湖北省恩施市板桥镇恩施程丰农业综合开发有限

公司重楼属植物种质资源圃, 由湖北省农业科学院中药材研究所由金文副研究员鉴定, 具体名称 (参考《中国植物志》和《重楼属植物》) 及编号见表 1。选取处于花期、生长良好的健康幼嫩重楼叶片, 蒸馏水洗净擦干, 液氮处理后于 -80 °C 保存, 用于基因组 DNA 的提取。Taq Master Mix 及核酸染料均购自天恩泽生物技术有限公司, 电泳仪购自北京六一生物科技有限公司, PCR 仪器购自伯乐 (BioRad 公司, 美国) 生命医学产品 (上海) 有限公司。使用的 21 条 CDDP 引物由 Collard 和 Mackill^[8]设计, 引物由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 重楼属植物样品信息

Table 1 Sample information of *Paris* species

种名	拉丁名	编号
七叶一枝花	<i>P. polyphylla</i> Smith	CL1
狭叶重楼	<i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i> Franch	CL2
华重楼	<i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i> (Franch) et H. Hara	CL3
金线重楼	<i>P. delavayi</i> Franch	CL4
长药隔重楼	<i>P. polyphylla</i> var. <i>pseudothibetica</i> H. Li	CL5
球药隔重楼	<i>P. fargesii</i> var. <i>fargesii</i>	CL6
短瓣球药隔重楼	<i>P. fargesii</i> var. <i>brevipetalata</i> (Huang et Yang) H. Li	CL7
白花重楼	<i>P. polyphylla</i> var. <i>alba</i> H. Li & R. J. Mitchell	CL10
宽瓣球药隔重楼	<i>P. fargesii</i> var. <i>latipetala</i> H. Li et V. G. Soukup	CL12
滇重楼	<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> (Franch) et Handel -Mazzetti	CL14
黑籽重楼	<i>P. thibetica</i> Franch	CL15
无瓣黑籽重楼	<i>P. thibetica</i> var. <i>apetala</i> Handel -Mazzetti	CL16
具柄重楼	<i>P. fargesii</i> var. <i>petiolata</i> (Baker ex C. H. Wright) F. T. Wang & Tang	CL17

2 方法

2.1 重楼基因组 DNA 的提取

采用康为世纪生物科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行重楼基因组 DNA 的提取, 提取的 DNA 经超微量分光光度计 (Nanodrop one, Thermo Fisher) 检测 DNA 浓度和纯度。

2.2 CDDP 标记扩增程序

CDDP-PCR 扩增体系为 20 μ L, 包含 10.5 μ L 2 $\times$ Taq Master Mix, 5.4 μ L 2.5 μ mol/L 引物, 1.8 μ L DNA (50 ng/ μ L), 加灭菌 ddH₂O 补齐体积至 20 μ L。反应程序为 94 °C, 5 min; 然后 94 °C, 0.5 min; 45~

55 ℃, 1 min; 72 ℃, 1.5 min; 40 个循环; 循环结束后 72 ℃再延伸 10 min, PCR 程序结束后扩增产物置于 4 ℃冰箱中保存。

2.3 标记扩增产物的检测

采用质量分数为 1%的琼脂糖凝胶检测 CDDP 标记扩增产物,在 1%的琼脂糖凝胶中加入 6~8 μL 核酸染料用于片段显色,电泳程序为 120 V 电压下恒压电泳 60 min,电泳缓冲液为 1×TBE 溶液,上样量为 2.5 μL。电泳结束后,将琼脂糖凝胶转移至凝胶成像仪,在 302 nm 波长下进行拍照观察。

2.4 数据统计与分析

13 份重楼属资源均使用 Collard 和 Mackill^[8]设计的 21 条引物进行筛选扩增,重复 3 次,选取扩增结果稳定、条带清晰的 CDDP 引物进行统计分析。根据扩增结果,选择易辨识且多态性较好的 DNA 条带,采用“0-1”矩阵数据统计法记录扩增结果。在相同迁移率的位置上有条带的记为“1”,无条带的记为“0”。采用 popgene32 进行遗传多样性分析,计算 Nei's 遗传多样性指数 (H) 和 Shannon 信息指数 (I) 等遗传多样性指标。采用 NTSYS-pc 2.1 软件计算遗传相似系数 (GS),并根据遗传相似系数矩阵,利用 UPGMA 法进行聚类分析。根据建立的“0-1”矩阵,参照扩增图谱的 DNA marker 相对分子质量,以扩增条带相对分子质量大小和条带的有无作为种质鉴别的参考依据,按照 CODE128 条形

码编码方法制作便于识别的条形码身份证。

3 结果与分析

3.1 CDDP 引物扩增的多态性分析

从 21 条 CDDP 引物中筛选出 11 条多态性好、条带清晰稳定的引物(表 2)。利用筛选的 11 条引物对 13 个重楼属资源基因组 DNA 进行 PCR 扩增,共检测到 80 个位点,平均 7.27 个位点,其中多态性位点 73 个,多态性位点比例达到 91.25%,各引物扩增的片段相对分子质量在 200~2 000 bp(表 2 和图 1)。CDDP 扩增结果表明,13 份重楼属种质资源遗传多样性丰富;不同引物的多态性差异较大,其中引物 ERF1、ERF2、MADS-1、MADS-2 和 MADS-4 的多态位点百分率最高,为 100%,而引物 KNOX-1 的多态性位点百分率最低,为 66.67%。

3.2 重楼种质资源遗传多样性分析

11 条引物分别扩增 13 份重楼属种质资源,共获得 80 条扩增条带,有效等位基因数 (N_e) 为 1.589 6±0.311 4, I 为 0.507 0±0.201 6,等位基因数 (N_a) 为 (1.912 5±0.284 3), H 为 (0.342 3±0.150 9),多态性条带比率 (P) 为 91.25%,这表明 13 份重楼属种质资源种间存在丰富的遗传多样性。用 NTSYS-pc 2.1 软件计算重楼属种质资源居群间的遗传距离和遗传相似系数(表 3),结果表明重楼属资源种群间的遗传一致度变化范围在 0.475 0~0.925 0,遗传距离为 0.078 0~0.744 4。其中黑籽重

表 2 用于重楼属资源遗传多样性分析的 CDDP 引物及其扩增结果

Table 2 CDDP primers and amplification results for *Paris* genus germplasm resources genetic diversity analysis

引物名称	目的基因	序列 (5'→3')	退火温度/℃	扩增条带总数量/条	多态性条带数量/条	多态位点百分率/%	片段大小/bp
ABP1-2	ABP	ACSCSATCCACCGG	45.0	10	9	90	300~2 000
ABP1-3		CACGAGGACCTSCAGG	45.9	10	9	90	200~2 000
ERF1	ERF	CACTACCGCGGCTSCG	51.5	8	8	100	200~1 200
ERF2		GCSGAGATCCGSGACCC	51.5	7	7	100	300~1 500
KNOX-1	KNOX	AAGGSAAGCTSCSAAG	47.5	6	4	66.67	200~500
KNOX-2		CACTGGTGGGAGCTSCAC	49.7	5	4	80	200~800
KNOX-3		AAGCGSCACTGGAAGCC	46.7	10	9	90	200~1 000
MADS-1	MADS	ATGGGCCGSGGCAAGGTGC	54.6	7	7	100	300~1 250
MADS-2		ATGGGCCGSGGCAAGGTGG	54.6	7	7	100	150~1 000
MADS-4		CTSTGCGACCGSGAGGTG	52.0	6	6	100	200~1 250
MYB-2	MYB	GGCAAGGGCTGCCGG	47.7	4	3	75	400~1 000
总计	—	—	—	80	73	—	—
平均值	—	—	—	7.27	6.64	91.25	—

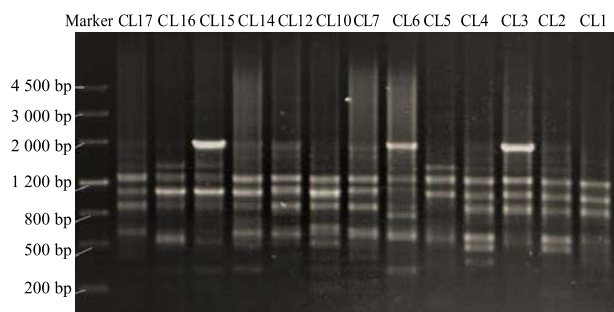


图 1 引物 ABP1-2 对 13 个重楼属种质资源的扩增图谱

Fig. 1 Amplification pattern of 13 types of *Paris* genus germplasm resources by ABP1-2

表 3 13 个重楼属资源相似系数 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 3 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) for 13 types of *Paris* genus germplasm resources

编号	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL10	CL12	CL14	CL15	CL16	CL17
CL1	****	0.850 0	0.737 5	0.725 0	0.625 0	0.650 0	0.675 0	0.787 5	0.662 5	0.550 0	0.537 5	0.537 5	0.712 5
CL2	0.162 5	****	0.762 5	0.825 0	0.550 0	0.650 0	0.750 0	0.762 5	0.712 5	0.575 0	0.512 5	0.562 5	0.687 5
CL3	0.304 5	0.271 2	****	0.737 5	0.537 5	0.612 5	0.662 5	0.700 0	0.650 0	0.612 5	0.575 0	0.575 0	0.725 0
CL4	0.321 6	0.192 4	0.304 5	****	0.550 0	0.600 0	0.650 0	0.737 5	0.662 5	0.600 0	0.537 5	0.562 5	0.712 5
CL5	0.470 0	0.597 8	0.620 8	0.597 8	****	0.575 0	0.575 0	0.512 5	0.662 5	0.475 0	0.637 5	0.637 5	0.537 5
CL6	0.430 8	0.430 8	0.490 2	0.510 8	0.553 4	****	0.650 0	0.587 5	0.662 5	0.600 0	0.512 5	0.487 5	0.637 5
CL7	0.393 0	0.287 7	0.411 7	0.430 8	0.553 4	0.430 8	****	0.637 5	0.812 5	0.700 0	0.487 5	0.487 5	0.612 5
CL10	0.238 9	0.271 2	0.356 7	0.304 5	0.668 5	0.531 9	0.450 2	****	0.650 0	0.612 5	0.550 0	0.575 0	0.725 0
CL12	0.411 7	0.339 0	0.430 8	0.411 7	0.411 7	0.411 7	0.207 6	0.430 8	****	0.637 5	0.600 0	0.600 0	0.675 0
CL14	0.597 8	0.553 4	0.490 2	0.510 8	0.744 4	0.510 8	0.356 7	0.490 2	0.450 2	****	0.512 5	0.487 5	0.637 5
CL15	0.620 8	0.668 5	0.553 4	0.620 8	0.450 2	0.668 5	0.718 5	0.597 8	0.510 8	0.668 5	****	0.925 0	0.500 0
CL16	0.620 8	0.575 4	0.553 4	0.575 4	0.450 2	0.718 5	0.718 5	0.553 4	0.510 8	0.718 5	0.078 0	****	0.500 0
CL17	0.339 0	0.374 7	0.321 6	0.339 0	0.620 8	0.450 2	0.490 2	0.321 6	0.393 0	0.450 2	0.693 1	0.693 1	****

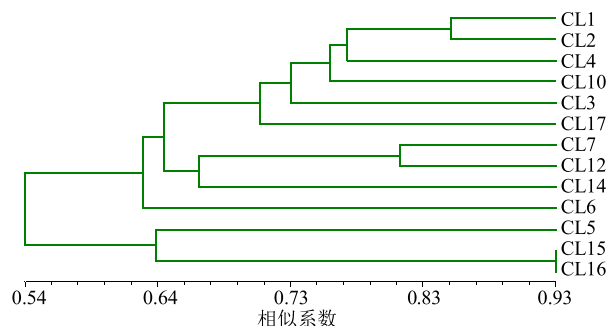


图 2 13 份重楼属种质资源基于 CDDP 的遗传相似性 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 13 germplasm resources of *Paris* genus by UPGMA method

球药隔重楼 (CL6)、短瓣球药隔重楼 (CL7)、白花重楼 (CL10)、宽瓣球药隔重楼 (CL12)、滇重楼

楼 (CL15) 和无瓣黑籽重楼 (CL16) 的遗传距离最近 (0.078 0), 说明二者亲缘关系最近, 相应的遗传一致度最高, 达到 0.925 0。而长药隔重楼 (CL5) 和滇重楼 (CL14) 的遗传距离最远 (0.744 4), 说明二者亲缘关系较远, 遗传一致度最低 (0.475 0)。

3.3 聚类分析

采用 NTSYS 2.1 软件计算 13 个供试样品间的 GS 遗传相似性系数并作 UPGMA 聚类图 (图 2)。结果表明, 当遗传相似性系数为 0.62 时, 13 份重楼属种质资源分为 2 类, 其中七叶一枝花 (CL1)、狭叶重楼 (CL2)、华重楼 (CL3)、金线重楼 (CL4)、

(CL14)、具柄重楼 (CL17) 分为 1 组, 而长药隔重楼 (CL5)、黑籽重楼 (CL15)、无瓣黑籽重楼 (CL16) 聚为 1 组, 说明第 1 组的 10 个重楼属种质资源遗传关系较近, 可以比较容易地通过 CDDP 标记就和第 2 组的 3 个重楼属种质资源区分开。

当遗传相似性系数为 0.64 时, 第 1 组的 10 个重楼属种质资源可进一步分为 2 组, 其中七叶一枝花 (CL1)、狭叶重楼 (CL2)、华重楼 (CL3)、金线重楼 (CL4)、短瓣球药隔重楼 (CL7)、白花重楼 (CL10)、宽瓣球药隔重楼 (CL12)、滇重楼 (CL14)、具柄重楼 (CL17) 聚为 1 组, 而球药隔重楼 (CL6) 单独聚为 1 组。同时, 第 2 组长药隔重楼 (CL5)、黑籽重楼 (CL15)、无瓣黑籽重楼 (CL16) 可以进一步分为 2 组, 其中黑籽重楼

(CL15)、无瓣黑籽重楼 (CL16) 单独聚为 1 组，而长药隔重楼 (CL5) 自成 1 组，说明黑籽重楼和其变种无瓣黑籽重楼遗传背景较为相似，而长药隔重楼则与二者差异显著，可以通过 CDDP 标记进行区分。

3.4 重楼属植物的指纹图谱和条形码分子身份证构建

通过对 13 个重楼属种质资源的 CDDP 扩增图谱分析，检测到 2 个重楼属资源的特征条带各 1 个，分别是引物 ERF2 对滇重楼 (CL14) 基因组 DNA 扩增的 1 000 bp 左右的特异性片段和引物 ABP1-3 对球药隔重楼 (CL6) 基因组 DNA 扩增的 900 bp 左右的特异性片段 (图 3)。这 2 个特异性条带可以作为分子鉴定滇重楼和球药隔重楼的重要依据。

在筛选的 11 条多态性好、扩增条带清晰稳定的 CDDP 引物基础上，结合特异性条带扩增引物的统计分析，从中选择 ABP1-2、ABP1-3、ERF-1 这 3 条引物作为重楼属种质资源鉴定的核心引物。根据这 3 个引物对 13 个重楼属种质资源扩增条带的统计分析，以扩增条带相对分子质量大小和条带数目作为重楼属资源鉴定的重要依据，本研究构建了 13 份重楼属种质资源的 CDDP 标记指纹图谱和条形码分子身份证。分子身份证基于扩增条带的有无情况，有带记为“1”，无带记为“0”，生成 (0, 1) 字符串，利用条形码生成器，按照 CODE128 编码规则制作可辨识的条形码分子身份证 (图 4 和表 4)，用于重楼属种质资源的快速和准确鉴定。

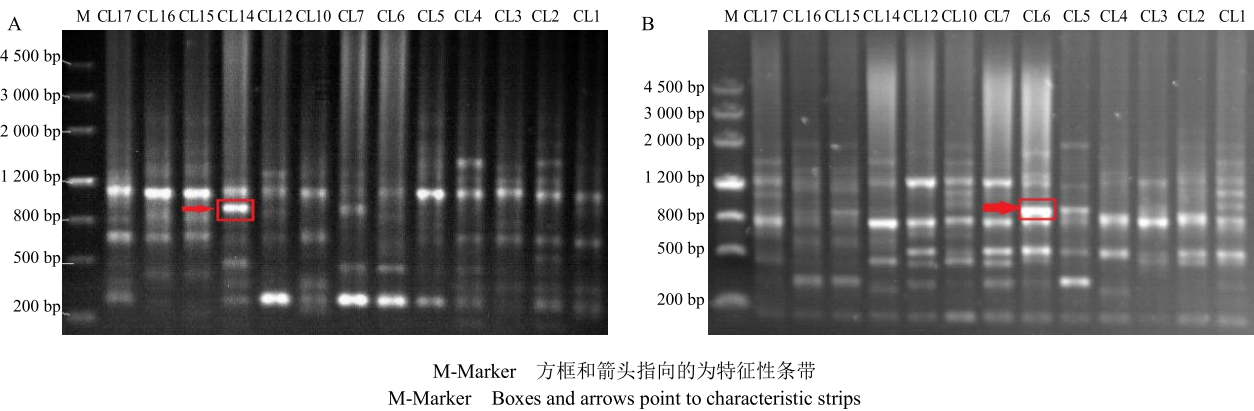


图 3 引物 ERF2 (A) 和 ABP1-3 (B) 对 13 个重楼属种质资源进行扩增的 CDDP 图谱
Fig. 3 CDDP amplification pattern of 13 germplasm resources of *Paris* genus by ERF2 (A) and ABP1-3 (B)

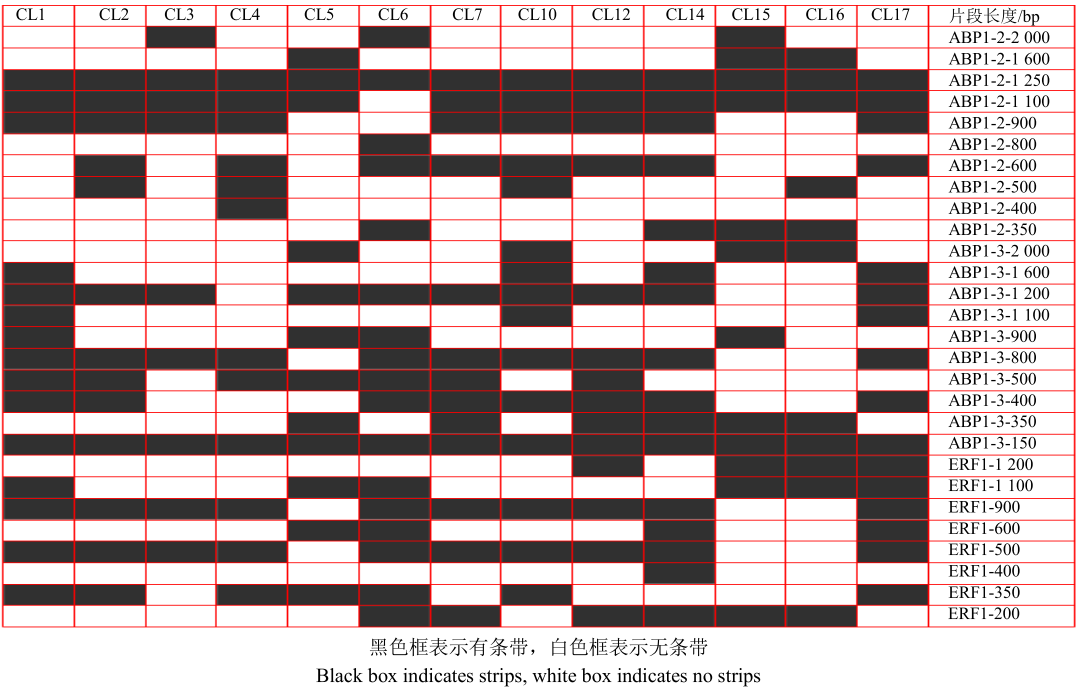


图 4 CDDP 标记构建 13 份重楼属资源指纹图谱
Fig. 4 Fingerprint of 13 germplasm resources of *Paris* genus by CDDP

表 4 13 份重楼属资源的条形码分子身份证

Table 4 Molecular identity of 13 germplasm resources of *Paris* genus by CDDP marker

品种	条形码分子身份证	品种	条形码分子身份证
七叶一枝花	 00111000000111111010101010	白花重楼	 0011101100111101010100101010
狭叶重楼	 0011101100001001110100101010	宽瓣球药隔重楼	 0011101000001001111110101001
华重楼	 1011100000001001000100101000	滇重楼	 00111010010101001011100111101
金线重楼	 0011101110000001100100101010	黑籽重楼	 1111000001100010001111000001
长药隔重楼	 0111000000101010101010100101	无瓣黑籽重楼	 0111000101100000001111000001
球药隔重楼	 101001100100101111010111011	具柄重楼	 001110100001110101011111010
短瓣球药隔重楼	 0011101000001001111100101001		

4 讨论

遗传多样性分析及指纹图谱的构建等是植物新品种选育的基础^[16]。DNA 分子标记是生物个体在 DNA 水平上遗传变异的直接反映,对植物遗传多样性分析、遗传图谱的构建等具有重要意义^[17]。目前,DNA 分子标记技术已被应用于重楼种质资源的遗传多样性及亲缘关系的分析,且应用较多的为随机 DNA 分子标记,如 SSR、ISSR 及 SCoT 等^[3,12,18]。多态性位点比例是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标,是度量遗传多样性的重要参数^[19]。何俊等^[18]对多叶重楼的遗传多样性的 ISSR 分子标记分析显示,物种水平上多态位点百分率(PPL)达 93.63%。辛本华等^[6]对重楼属植物遗传多样性的 RSAP 分子标记分析表明,其多态性比例为 81.01%。上述研究均表明重楼属资源遗传多样性丰富,与本研究结果相符。11 个 CDDP 引物对 13 份重楼属资源 DNA 的扩增结果,即 91.25% 的 PPL、 H_e 及 I 等均表明重楼属植物遗传多样性丰富,说明 CDDP 分子标记可以应用于重楼属植物遗传多样性分析。随机 DNA 分子标记是基于基因中随机多态位点开发而成,所得位点通常距目标性状基因较远,目标性差^[20]。而 CDDP 分子标记技术标记的是目的基因的一部分或者是目的基因的连锁,能克服标记的随机性^[21],在重楼属植物的遗传多样性分析中

更具优势。

在 CDDP 分子标记基础上建立的 UPGMA 聚类分析表明,长药隔重楼、黑籽重楼及无瓣黑籽重楼聚为一类,与其他 10 种重楼亲缘关系较远。李壮等^[3]采用 SCoT 标记对 40 份重楼属植物进行聚类分析,表明黑籽重楼与七叶一枝花聚为一组,狭叶重楼单独聚为一组,球药隔重楼、卵叶重楼、金线重楼及滇重楼聚为一组。本研究中黑籽重楼、无瓣黑籽重楼单独聚为一组,七叶一枝花、狭叶重楼聚为一组,这与李壮等研究结果不一致,可能是由不同的分子标记造成的聚类差异。李恒^[22]参考了重楼属各植物形态特征以及演化趋势,首先将重楼属分为侧膜胎座亚属和中轴胎座亚属,进而又根据雄蕊轮数、果实开裂与否、假种皮的有无等性状将球药隔重楼、黑籽重楼分在不同组。本研究结果显示,球药隔重楼、黑籽重楼聚类在不同分组,与《重楼属植物》^[22]相符。滇重楼与长药隔重楼之间的遗传距离较远(0.597 8),分别聚到了不同的组,这与何俊等^[23]和辛本华等^[6]的研究结果一致。

重楼属植物种类多样,外部形态相似,传统的性状鉴定和显微检测手段难以对重楼正品及其近缘种药材进行准确和快速鉴定,对中医处方和中成药的质量控制造成了较大的用药隐患^[24]。基于此,开发出快速鉴定重楼药材的有效方法对重楼属植物的系统鉴定、资源保护及重楼的用药安全等具有

重要意义。本研究在 CDDP 分子标记的基础上依据 CODE128 条形码编码规则为重楼属植物构建分子身份证的目的是快速、准确和高效地鉴别不同种质的遗传信息,因此,构建分子身份证时,要求所用的标记引物扩增的条带多态性要好,条带清晰稳定,检测方法快捷易上手。通过前期的筛选,选择 3 条多态性良好、带型清晰稳定的引物 ABP1-2、ABP1-3、ERF-1 作为 13 份重楼属药用植物鉴定的核心引物组合。以引物扩增条带数目和条带分子大小作为种质资源鉴定的基础,并依据 CODE128 条形码编码规则构建了 13 份重楼属药用植物的指纹图谱和条形码分子身份证,为重楼属药用植物鉴定的精准和便捷化奠定了基础,可用于科研工作与工业生产中重楼属植物的精准和快速鉴定。

参考文献

- [1] 杨远贵,张 霁,张金渝,等.重楼属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3301-3323.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 李 壮,辛本华,杨 华,等.重楼属植物遗传多样性的 SCOT 标记 [J]. 广西植物, 2014(3): 315-319.
- [4] 杨光义,胡 培,叶 方.重楼资源分布与可持续利用研究进展 [J]. 中国药师, 2016, 19(1): 159-162.
- [5] 成 莉,甄 艳,陈 敏,等.扩大重楼药用资源研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3121-3124.
- [6] 辛本华,田孟良,吴镔镔,等.重楼属植物遗传多样性的 RSAP 标记 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3425-3427.
- [7] 李莹莹,郑成淑.利用 CDDP 标记的菏泽牡丹品种资源的遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(13): 2739-2750.
- [8] Collard B C Y, Mackill D J. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(4): 558-562.
- [9] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(11): 554-560.
- [10] Jiang L, Zang D. Analysis of genetic relationships in *Rosa rugosa* using conserved DNA-derived polymorphism markers [J]. *Biot Biotechnol Equipt*, 2017, 11: 1-7.
- [11] 陈 燕,李婉茹,唐 红.不同花色紫斑牡丹的 CDDP 体系优化及其遗传多样性分析 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(10): 1823-1831.
- [12] 陈中苏直,田 波,蔡传涛.基于 SSR 分子标记的滇重楼遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1834-1838.
- [13] 王海明,阮成江,梁玖华,等.高通量 RNA-seq 技术开发梵净山重楼 SSR 标记 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 6059-6065.
- [14] 叶 方,柳施一,胡 培,等.武当山区重楼属植物基于 ITS2 的种内鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 550-558.
- [15] 朱英杰,陈士林,姚 辉,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [16] Ji L J, Qi W, Silva J A T D, et al. The genetic diversity of *Paeonia* L. [J]. *Sci Hort*, 2012, 143(1): 62-74.
- [17] 杨景华,王士伟,刘训言,等.高等植物功能性分子标记的开发与利用 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3429-3436.
- [18] 何 俊.滇重楼遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [19] 王 蕾,叶志云,蒋 焱,等.利用 ISSR 技术对优质红锥种质资源遗传多样性的分析 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(1): 91-94.
- [20] 熊发前,蒋 菁,钟瑞春,等.两种新型目标分子标记技术—CDDP 与 PAAP [J]. 植物生理学报, 2010, 46(9): 871-875.
- [21] 吴永辉,张君毅,司 灿,等.基于 CDDP 标记铁皮石斛抗性种质筛选与多样性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4748-4754.
- [22] 李 恒.重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [23] 何 俊,杨柏云,陈少风,等.多叶重楼遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物分类与资源学报, 2007, 29(4): 388-392.
- [24] 刘 涛,赵英良,杨 莹,等.滇重楼的 psbA-trnH 条形码分子鉴定研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 758-762.