

射干内生真菌 *Fusarium proliferatum* 的 ISSR 和 SRAP 位点遗传多样性分析

罗 琴¹, 赵 欢^{1*}, 彭正松², 李佩华², 杨玉霞³, 夏燕莉³, 邓 迪¹

1. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637009

2. 西昌学院, 四川 西昌 615013

3. 四川省中医药科学院, 四川 成都 625014

摘要: 目的 为了解射干内生真菌 *Fusarium proliferatum* 的遗传多样性。方法 选用了 52 条 ISSR 引物和 90 条 SRAP 引物对 17 株射干内生真菌 *F. proliferatum* 进行了遗传多样性分析。筛选出了 27 条 ISSR 引物和 38 条 SRAP 引物可用于遗传多样性分析。结果 结果, 27 条 ISSR 引物共扩增出了 178 个条带, 其中 131 条 (63%) 具有多态性; 38 条 SRAP 引物能够扩增出 357 条稳定性较好的条带, 其中 323 条 (91%) 具有稳定性差异。27 条 ISSR 引物 PCR 扩增产物的多态性信息量 (PIC) 介于 0.19~0.91, 平均为 0.70; 38 条 SRAP 引物 PCR 扩增产物的多态性信息量 PIC 介于 0~0.93, 平均为 0.73。聚类分析结果表明, 根据 27 个 ISSR、38 个 SRAP 及 ISSR+SRAP 遗传位点分析得出遗传相似系数变化范围分别为 0.73~0.99、0.72~0.95 和 0.73~0.95, 平均分别为 0.84、0.85 和 0.85。根据材料间的遗传相似系数聚类, 三者之间的聚类有较小的差异, 但总体上, 17 株内生真菌被聚为 3 大类, 分离自根的内生真菌 *F. proliferatum* 聚为一类, 分离自茎和叶的 *F. proliferatum* 聚集于另外两类。研究表明, 内生真菌 *F. proliferatum* 遗传相似性较大, 其亲缘关系较近, 与传统方法鉴定出的结果一致。结论 采用分子标记技术比传统的方法鉴定更为有效, 同时, ISSR 和 SRAP 标记可更真实地反映射干内生真菌 *F. proliferatum* 的遗传多样性, 为该内生真菌在分子生物技术方面的研究等提供一定参考。

关键词: 射干; 内生真菌; *Fusarium proliferatum*; 遗传多样性; ISSR; SRAP

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5847-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.028

Genetic diversity of endophytic fungi strains *Fusarium proliferatum* isolated from *Belamcanda chinensis* using ISSR and SRAP markers

LUO Qin¹, ZHAO Huan^{1*}, PENG Zheng-song², LI Pei-hua², YANG Yu-xia³, XIA Yan-li³, DENG Di¹

1. College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637009, China

2. Xichang College, Xichang 615013, China

3. Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 625014, China

Abstract: Objective In order to understand the genetic diversity of endophytic fungi strain *Fusarium proliferatum* isolated from *Belamcanda chinensis*. **Methods** A total of 52 ISSR primers and 90 SRAP primers were used to detect the genetic diversity among 17 *F. proliferatum* strains. **Results** The results indicated that 27 ISSR primers and 38 SRAP primers were screened out for the genetic diversity analysis. 178 bands were amplified from 27 ISSR primers, among which 131 (63%) allelic variations were detected. However, 357 bands were amplified by 38 SRAP primers, among which 323 (91%) allelic variations were detected. The value of allelic polymorphism information content (PIC) of ISSR primers ranged from 0.19 to 0.91, with the average of 0.70 per primer. The value of PIC of SRAP primers ranged from 0.00 to 0.93, with the average of 0.72 per primer. The value of Nei's genetic similarity (GS) indexes of 17 strains based on ISSR, SRAP and ISSR + SRAP genetic locus varied from 0.73—0.99, 0.72—0.95 and 0.73—0.95, and with the average of 0.84, 0.85 and 0.85, separately. Cluster analysis showed that the 17 strains in this study could be clustered into three groups, three strains from the roots were clustered together, and *F. proliferatum* strains isolated from stems and leaves were gathered in other two groups. Cluster analysis revealed that genetic similarity of 17 strains were high, this suggested that the 17 strains had a near relationship, in accordance with the traditional morphology identification. **Conclusion** The results show that the ISSR and SRAP

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 四川省教育厅重大培育项目 (15CZ0015); 西华师范大学博士启动基金 (15E025); 西华师范大学英才科研基金项目 (17YC364); 四川省大学生创新创业项目 (201810638100)

作者简介: 罗 琴 (1991—), 女, 四川宜宾人, 硕士, 西华师范大学生命科学院, 研究方向为植物遗传。Tel:15153454832 E-mail:3563895082@qq.com
*通信作者 赵 欢 (1982—), 女, 博士, 四川雅安, 讲师, 西华师范大学生命科学院, 研究方向为植物药理。E-mail: zhaohuan_2010@163.com

technology is more efficient than traditional morphology identification. It is also found that ISSR and SRAP markers could more really reflect the genetic diversity of endophytic fungi strain *F. proliferatum* from *B. chinensis*, which can provide the basis for the application of molecular biotechnology in endophytic fungi of *F. proliferatum* from *B. chinensis*.

Key words: *Belamcanda chinensis* (L.) DC.; endophytic fungi; *Fusarium proliferatum*; genetic diversity; ISSR; SRAP

植物的内生真菌指在它们的生活史中的某段时期生活在其植物组织内,并且对该植物组织不会引起明显的病害症状的真菌。1993 年,美国蒙拿大大学植物病理学系 Strobel 等^[1]利用药用植物太平洋红豆杉 *Taxus brevifolia* (Pilger) Rehd. 树皮分离得到一株能够合成与宿主相同的抗癌药物(紫杉醇)的内生真菌 *Taxomyces andreanae*,自此内生真菌的研究逐渐变为热点。层出镰刀菌 *Fusarium proliferatum* 为常见的一类内生真菌,广泛存在于丹参^[2]、博落回^[3]、木豆^[4]、海带^[5]、海洋红树^[6]、红果木^[7]等植物中,其含有生物碱、黄酮、皂苷、类固醇、蒽醌和萜类等丰富的活性物质,且具有抗氧化^[2]、抗肿瘤^[6]等活性。此外, *F. proliferatum* 还可产生与宿主植物相似的次生代谢产物,如闵长莉等^[3]从博落回中分离获得了 1 株内生真菌 *F. proliferatum* BLH51,其发酵液中含有血根碱。故 *F. proliferatum* 是一类具研究和开发价值的内生真菌。

射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC. 为鸢尾科射干属多年生草本植物,具有耐寒、耐旱、耐瘠薄、花期长等特点^[8]。现代研究表明,射干主要含有异黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗氧化及抗肿瘤等作用,可选择性地治疗和预防心血管疾病,具有较好的开发利用前景^[9-10]。目前,对射干的研究主要集中于栽培育种、有效成分、药理活性等方面,有关射干内生真菌方面的研究尚无报道。

简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)是由 Zietkiewicz 等^[11]以 SSR 为基础发展起来的一种分子标记技术。ISSR 引物是按照基因组中微卫星序列设计的含锚定碱基的寡聚核苷酸链,其长度大多数都在 15~24 bp,由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成^[12]。SRAP(sequence-related amplified polymorphism)是一种以相关序列扩增多态性为基础的新型分子标记技术,通过以基因的开放阅读框(ORF)的相对保守的外显子区域与具有丰富变异的内含子及其启动子区域进行 PCR 扩增,从而得到个体或者物种两者之间的遗传差异和分化^[13-14]。2 种标记技术均具有操作简便、检测快速灵敏、成本

低、DNA 用量少、条带多态性高等特点,现已广泛应用于物种遗传多样、遗传结构、种质鉴定、物种形成与亲缘关系分析等研究领域^[15-16]。

课题组前期已采用组织块法分离了射干根、茎和叶中的内生真菌,共获得 26 株内生菌株。通过形态学结合 ITS 区序列分析,将其初步分为 5 属 6 种,其中 *Fusarium proliferatum* 为优势菌种,共 17 株。在此基础上,本研究采用 ISSR 和 SRAP 标记对 17 株的遗传多样性和指纹图谱鉴定进行了分析,以期为该内生真菌在分子遗传方面的研究等提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料于 2016 年 10 月采集于四川省雅安市,经西华师范大学甘小红教授鉴定为射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC.。内生真菌 *F. proliferatum* 为课题组从射干中分得并纯化,其中,3 株内生真菌(编号为 G1、G2、G3)从射干根中分得,4 株内生真菌(编号 J2、J10、J11、J12)从其茎上分得,10 株内生真菌(Y1、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10、Y11)从其叶中分得。

1.2 DNA 提取

从培养基上分离纯化出射干内生真菌菌丝体,选取其生长势好的菌丝体进行 DNA 提取。提取其 DNA 按照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法步骤提取。

1.3 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳

利用 Nagaoka 等^[17]的 52 条 ISSR 引物序列(表 1)及采用 Li 等^[18]发表的 SRAP 引物,并以此为基础来改变引物 3'端的 3 个选择性碱基进行随机组合,共组成的 90 对引物序列组合(表 2)送至上海生物工程公司合成。PCR 扩增总体积为 10 μ L: 5 μ L 2 $\times$ TaqPCR MasterMix, 2.5 μ L ddH₂O, 1 μ L (10 ng/ μ L) ISSR/SRAP 引物, 1.5 μ L DNA。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 共 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s(退火温度按照具体引物而定), 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 12 $^{\circ}$ C 保存。ISSR-PCR 扩增的产物使用 2%的

表 1 ISSR 标记的引物

Table 1 Primers of ISSR

引物 (UBC)	序列 (5'→3')	引物 (UBC)	序列 (5'→3')
801	ATATATATATATATATT	862	AgCAGCAGCAGCAGCAGC
802	ATATATATATATATATg	863	AgTAGTAGTAGTAGTAGT
803	ATATATATATATATATC	864	ATgATgATgATgATgATg
804	TATATATATATATATAA	865	CCgCCgCCgCCgCCgCCg
805	TATATATATATATATAC	868	gAAGAAgAAgAAgAAgAA
836	AgAgAgAgAgAgAgAgYA	869	gTTgTTgTTgTTgTTgTT
840	gAgAgAgAgAgAgAgAYT	870	TgCTgCTgCTgCTgCTgC
841	gAgAgAgAgAgAgAgAYC	871	TATTATTATTATTATTAT
842	gAgAgAgAgAgAgAgAYg	872	gATAgATAgATAgATAg
843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	873	gACAgACAgACAgACAg
844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	876	gATAgATAgACAgACAg
845	CTCTCTCTCTCTCTCTRg	878	ggATggATggATggAT
846	CACACACACACACACART	879	CTTCACTTCACTTCA
847	CACACACACACACACARC	880	ggAgAggAgAggAgAg
848	CACACACACACACACARg	882	VBVATATATATATATAT
849	gTgTgTgTgTgTgTYA	883	BVBTATATATATATATATA
850	gTgTgTgTgTgTgTYC	887	DVDCTCTCTCTCTCTCTC
851	gTgTgTgTgTgTgTYg	889	DBDACACACACACACAC
852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA	893	NNNNNNNNNNNNNNNN
853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	894	TggTAGCTCTTgATCANNNN
854	TCTCTCTCTCTCTCTCRg	895	AgAgTTggTAGCTCTTgATC
855	ACACACACACACACACYT	896	AggTCgCggCCgCNNNNNNATg
856	ACACACACACACACACYA	897	CCgACTCgAgNNNNNNATgTgg
859	TgTgTgTgTgTgTgRC	898	gATCAAgCTTNNNNNNATgTgg
860	TgTgTgTgTgTgTgRA	899	CATggTgTTggTCATTgTTCCA
861	ACCACCACCACCACCACC	900	ACTTCCCCACAggTTAACACA

表 2 SRAP 正、反向引物

Table 2 Sequences of forward and reverse primers of SRAP used in this study

名称	正向引物 (5'→3')	名称	反向引物 (5'→3')
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me15	TGAGTCCAAACCGGACT	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me16	TGAGTCCAAACCGGACG	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me24	TGAGTCCAAACCGGTCG	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me28	TGAGTCCAAACCGGGAC	em7	GACTGCGTACGAATTCCA
me32	TGAGTCCAAACCGGGCT	em9	GACTGCGTACGAATTCTGA
me41	TGAGTCCAAACCGGCTG	em10	GACTGCGTACGAATTCTAG
me42	TGAGTCCAAACCGGCTC	em16	GACTGCGTACGAATTGAT
me43	TGAGTCCAAACCGGCCA	em19	GACTGCGTACGAATTATC
		em26	GACTGCGTACGAATTTGT

琼脂糖凝胶进行电泳检测。SRAP-PCR 反应程序为预变性 94 ℃, 5 min; 接着进入第 1 个循环: 变性 94 ℃, 1 min, 退火 35 ℃, 1 min, 延伸 72 ℃, 1 min, 共 4 个循环; 进行第 2 循环: 变性 94 ℃, 1 min, 退火 54 ℃, 1 min, 延伸 72 ℃, 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 ℃继续延伸 10 min, 12 ℃保存。SRAP-PCR 扩增的产物使用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.4 数据分析

每个材料的扩增条带按照有或者无记录数据, 扩增条带存在时就赋值为“1”, 反之赋值为“0”, 对 ISSR、SRAP 和 ISSR+SRAP 所有的引物检测结果建立 0 与 1 数据矩阵。遗传多样性分析则采用国际上通用的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC) 表示。PIC 是指一个标记根据该可检测等位基因数目和它们分布频率, 从而得到此分子标记在某个群体中检测到的多态性。PIC 的值是按照 Anderson 等^[19]的方法计算得到。

$$PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$$

P_{ij} 表示标记 i 的第 j 个带型出现的频率, 此标记 i 的总带型是从 1 到 n , PIC 值在 0~1, “0”表示没有多态性, “1”表示具有极其高的多态性

按照 Nei 等^[20]的方法可以计算出各个材料之间的遗传相似系数[GS, $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$], 其中, N_i 代表第 i 个材料的扩增带数量, N_j 代表第 j 个材料的扩增带数量, N_{ij} 代表第 i 、 j 个材料之间共有的条带数量。根据 GS 值使用不加权重对算术平均法 UPGMA 进行聚类分析, 建立起遗传相似系数的聚类图。该聚类分析采用的分析软件为 NTSYS2.1。

2 结果与分析

2.1 ISSR 位点多态性分析

利用 Nagaoka 等^[17]的 52 条 ISSR 引物序列, 进行 PCR 扩增, 仅有 27 条引物能够得到稳定性较好的条带, 且具多态性(表 3)。故选取了这 27 条 ISSR 引物进行遗传多样性分析。17 份材料总共扩增出 178 个条带, 每条引物能扩增出的条带数为 2~17, 平均为 6.59, 其中引物 UBC880 与 UBC887 扩增的条带数量最多, 扩增的条带数量最少的为引物 UBC853 和 UBC854; 总共检测到 131 (占 63%) 个多态性位点, 多态性位点数在 0~17 个, 平均多态性点为 4.85 个, 不同引物扩增出条带的多态性具有明显的差异。引物 UBC836 和 UBC861 多态性比

表 3 ISSR-PCR 扩增产物多态性

Table 3 Polymorphic amplified products of ISSR-PCR

引物 (UBC)	扩增条带数	多态条带数	多态百分率/%	PIC
836	8	0	0.00	0.88
840	7	4	0.57	0.81
842	8	6	0.75	0.78
843	3	1	0.33	0.57
844	5	4	0.80	0.76
845	3	2	0.67	0.42
846	3	2	0.67	0.57
847	3	1	0.33	0.66
848	6	2	0.33	0.80
849	5	4	0.80	0.79
850	9	8	0.89	0.79
851	7	7	1.00	0.81
852	3	3	1.00	0.42
853	2	1	0.50	0.49
854	2	1	0.50	0.19
855	7	4	0.57	0.85
856	3	1	0.33	0.67
860	4	1	0.25	0.68
861	3	0	0.00	0.67
862	6	6	1.00	0.76
864	4	1	0.25	0.74
865	4	4	1.00	0.28
868	12	8	0.67	0.88
872	13	12	0.92	0.87
873	14	14	1.00	0.88
880	17	17	1.00	0.91
887	17	17	1.00	0.89
总计	178	131		
平均值	6.59	4.85	0.63	0.70

率最低 (0.00), 引物 UBC851、UBC852、UBC862、UBC865、UBC873、UBC880 和 UBC887 的多态性比率为 1, 变化范围大。按照 Anderson^[18]的方法计算出 27 条高效引物对 17 份供试材料的位点 PIC 的值。PIC 值介于 0.19~0.91, 平均为 0.70, 变幅比较大, 其中引物 UBC880 检测到 17 个多态性位点, PIC 值最高, 超过一半的引物 PIC 值在 0.70 以上, 某几个引物的 PIC 值偏低, 如引物 UBC854 为 0.19, 引物 UBC845 与 UBC852 都为 0.42, 引物 UBC852 为 0.49。引物 UBC841 的 PCR 扩增结果见图 1。总体而言, 27 条引物在材料之间的多态性比较高。从表 3 中还可看出, 位点多态性信息量与多态性比率不完全一致。

2.2 SRAP 位点多态性分析

采用 Li 等^[18]发表的引物并以此为基础来改变

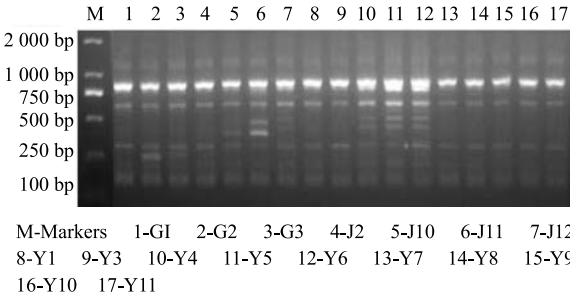


图 1 ISSR 引物 UBC841 对 17 份材料的扩增结果

Fig. 1 A PCR profile reaction of UBC841 marker for 17 materials

引物 3'端 3 个选择性碱基进行的随机组合，共组成的 90 对引物序列组合，进行 PCR 扩增，仅有 38 对引物组合能够得到稳定性较好的条带，且具多态性（表 4）。故选用了这 38 对引物组合进行遗传多样性分析。17 份材料总共扩增出 357 个条带，每个引物组合能扩增出的条带数为 1~28，平均为 9.39，其中引物组合 me15-em7 扩增的条带数量最多，最少的为引物组合 me32-em9 和 me42-em7；总共检测到 323（占 91%）个多态性位点，多态性位点数在 1~25 个，平均多态性点为 8.50 个，不同引物组合扩增出条带的多态性具有明显的差异。引物组合 me5-em1 多态性比率最低（0.5），其中多态性比率为 1 的引物组合在一半以上（20 个引物组合），总体上多态性比率很高。按照 Anderson^[19]的方法计算出 38 对高效引物组合对 17 份供试材料的 PIC 值。PIC 值介于 0.00~0.93，平均为 0.73，变幅很大，其中引物组合 me15-em7 和 me24-em26 分别检测到 25 和 23 个多态性位点，PIC 值最高，大部分的引物组合（29 个引物组合）PIC 值在 0.70 以上，个别引物组合的 PIC 值偏低，如 me32-em9（0）、me42-em7（0）、me5-em1（0.26）、me41-em7（0.41）以及 me32-em6（0.44）。引物组合 me15-em7 的 PCR 扩增图谱见图 2。总体而言，38 对引物组合在材料之间的多态性较高。从表 4 中也还可看出，位点多态性信息量与多态性比率不完全一致。

2.3 遗传差异分析

2.3.1 ISSR 多态性遗传差异分析 按 Nei 等^[20]的方法和采用分析软件为 NTSYS2.1 计算出各材料之间的遗传相似系数（GS），17 份材料的遗传相似系数矩阵见表 5。GS 变化范围为 0.73~0.99，平均为 0.84，遗传相似性变化较大且较大。在这些材料中，Y9 与 Y10 间的遗传相似性最高，遗传距离最小，GS 值高达 0.99，说明亲缘关系最近；G1 与 G2，

表 4 SRAP-PCR 扩增产物多态性

Table 4 Polymorphic amplified products of SRAP-PCR

引物(UBC)	扩增条带数	多态条带数	多态百分率/%	PIC
me5-em1	2	1	0.50	0.26
me5-em6	6	6	1.00	0.72
me5-em7	8	6	0.75	0.81
me5-em9	6	5	0.83	0.79
me5-em10	5	4	0.80	0.74
me5-em19	10	9	0.90	0.83
me5-em26	8	6	0.75	0.81
me15-em1	5	5	1.00	0.70
me15-em2	20	17	0.85	0.92
me15-em7	28	25	0.89	0.93
me15-em9	9	8	0.89	0.83
me16-em1	15	15	1.00	0.87
me16-em7	15	15	1.00	0.91
me16-em9	12	10	0.83	0.82
me16-em19	13	13	1.00	0.87
me16-em26	20	20	1.00	0.91
me24-em1	12	7	0.58	0.89
me24-em2	10	7	0.70	0.89
me24-em6	16	14	0.88	0.91
me24-em7	14	12	0.86	0.89
me24-em26	25	23	0.92	0.93
me28-em2	15	10	0.67	0.90
me28-em4	11	10	0.91	0.77
me28-em6	7	7	1.00	0.83
me28-em26	3	3	1.00	0.61
me32-em2	5	5	1.00	0.77
me32-em4	5	5	1.00	0.77
me32-em6	2	2	1.00	0.44
me32-em9	1	1	1.00	0
me41-em6	6	6	1.00	0.81
me41-em7	6	6	1.00	0.41
me41-em9	2	2	1.00	0.50
me42-em2	3	3	1.00	0.48
me42-em6	11	11	1.00	0.87
me42-em7	1	1	1.00	0
me43-em6	9	9	1.00	0.78
me43-em7	10	10	1.00	0.83
me43-em9	4	4	1.00	0.66
总计	357	323		
平均值	9.39	8.50	0.91	0.73

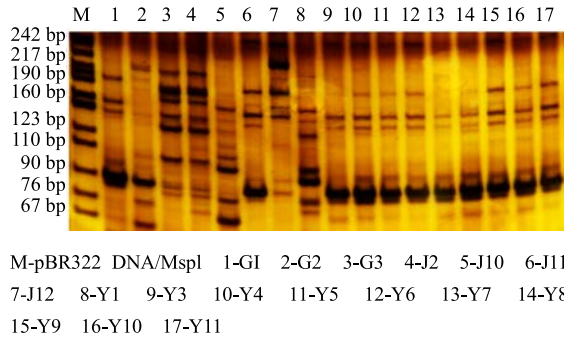


图2 SRAP 引物组合 me15-em7 对 17 份材料的多态性图谱
Fig. 2 SRAP polymorphism map of me15-em7 marker for 17 materials

表 5 17 份材料基于 ISSR 多态性的遗传相似系数矩阵

Table 5 Genetic similarity matrix based on ISSR polymorphism in 17 materials

编号	G1	G2	G3	J2	J10	J11	J12	Y1	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11
G1	1.00																
G2	0.90	1.00															
G3	0.87	0.88	1.00														
J2	0.74	0.75	0.76	1.00													
J10	0.84	0.81	0.78	0.75	1.00												
J11	0.82	0.79	0.78	0.73	0.90	1.00											
J12	0.82	0.81	0.82	0.76	0.87	0.91	1.00										
Y1	0.83	0.81	0.81	0.76	0.88	0.91	0.95	1.00									
Y3	0.79	0.79	0.79	0.74	0.85	0.86	0.91	0.88	1.00								
Y4	0.80	0.79	0.79	0.76	0.85	0.84	0.87	0.87	0.86	1.00							
Y5	0.79	0.77	0.78	0.76	0.84	0.86	0.89	0.91	0.87	0.89	1.00						
Y6	0.81	0.80	0.75	0.74	0.86	0.87	0.88	0.87	0.88	0.87	0.91	1.00					
Y7	0.79	0.78	0.75	0.74	0.85	0.85	0.86	0.87	0.84	0.83	0.91	0.91	1.00				
Y8	0.78	0.78	0.74	0.76	0.85	0.84	0.85	0.85	0.85	0.84	0.88	0.92	0.92	1.00			
Y9	0.81	0.79	0.78	0.74	0.83	0.84	0.86	0.85	0.83	0.82	0.87	0.89	0.90	0.91	1.00		
Y10	0.81	0.80	0.79	0.74	0.84	0.85	0.86	0.86	0.82	0.83	0.88	0.88	0.90	0.90	0.99	1.00	
Y11	0.82	0.81	0.78	0.73	0.84	0.85	0.87	0.86	0.82	0.85	0.87	0.88	0.88	0.89	0.95	0.96	1.00

遗传差异分析, 计算出各材料之间的 GS, 17 份材料的遗传相似系数矩阵见表 6。GS 变化范围为 0.72~0.95, 平均为 0.85, 遗传相似性变化较大且较大。在这些材料中, Y1 与 Y7 间的遗传相似性最高, 遗传距离最小, GS 值高达 0.95, 说明亲缘关系最近; G1 与 G2, G3 与 G2, J11 与 J12、Y1、Y6、Y7、Y8、Y9 及 Y10, J12 与 Y1 和 Y5、Y6 及 Y7, 除去 Y3 与 Y1, Y4 与 Y6, Y3、Y4 与 Y5、Y7、Y8、Y9、Y10 及 Y11, 其余从叶中纯化出来内生真菌两两之间, 它们的 GS 值(>0.90) 都很高, 表明这些材料之间的遗传相似性高且亲

J11 与 J12 和 Y1, J12 与 Y1 和 Y3, Y5 与 Y1 和 Y6 及 Y7、Y8 与 Y6、Y7、Y9 及 Y10 之间, Y9、Y10、Y11、Y2 两两之间, 它们的 GS 值(>0.90) 都很高, 表明这些材料之间的遗传相似性高且亲缘关系较近; 其余材料之间的 GS 值介于 0.7~0.9, 则表明它们之间的遗传距离较前面的材料之间大, 亲缘关系相对较远; J2 与 J11 及 J2 与 Y11 之间的 GS 值最小(0.73), 遗传距离最大, 即两者之间的亲缘关系最远。

2.3.2 SRAP 多态性遗传差异分析 采用与 ISSR 多态性遗传差异分析相同的方法分析 SRAP 多态性

缘关系较近; 其余材料之间的 GS 值介于 0.7~0.9, 则表明它们之间的遗传距离较前面的材料之间大, 亲缘关系相对较远; J10 与 G3 之间的 GS 值最小(0.72), 遗传距离最大, 即两者之间的亲缘关系最远。

2.3.3 ISSR+SRAP 多态性遗传差异分析 采用与 ISSR 多态性遗传差异分析相同的方法分析 ISSR+SRAP 多态性遗传差异分析, 计算出各材料之间的 GS, 17 份材料的遗传相似系数矩阵见表 7。GS 变化范围为 0.73~0.95, 平均为 0.85, 遗传相似性变化较大且较高。在这些材料中, Y10 与 Y9、Y11

表 6 17 份材料基于 SRAP 多态性的遗传相似系数矩阵

Table 6 Genetic similarity matrix based on SRAP polymorphism in 17 materials

编号	G1	G2	G3	J2	J10	J11	J12	Y1	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11
G1	1.00																
G2	0.90	1.00															
G3	0.88	0.91	1.00														
J2	0.73	0.75	0.75	1.00													
J10	0.75	0.73	0.72	0.78	1.00												
J11	0.81	0.82	0.82	0.78	0.79	1.00											
J12	0.82	0.83	0.83	0.77	0.79	0.93	1.00										
Y1	0.80	0.83	0.83	0.79	0.78	0.93	0.92	1.00									
Y3	0.79	0.81	0.81	0.77	0.78	0.89	0.89	0.89	1.00								
Y4	0.78	0.78	0.78	0.77	0.79	0.85	0.87	0.88	0.84	1.00							
Y5	0.79	0.82	0.82	0.79	0.78	0.90	0.91	0.94	0.87	0.89	1.00						
Y6	0.81	0.83	0.83	0.78	0.78	0.91	0.94	0.92	0.91	0.88	0.93	1.00					
Y7	0.80	0.82	0.82	0.80	0.79	0.91	0.90	0.95	0.89	0.88	0.94	0.93	1.00				
Y8	0.82	0.81	0.81	0.77	0.82	0.90	0.88	0.92	0.86	0.89	0.90	0.90	0.92	1.00			
Y9	0.80	0.81	0.81	0.78	0.79	0.91	0.87	0.92	0.89	0.86	0.90	0.90	0.93	0.92	1.00		
Y10	0.82	0.83	0.83	0.78	0.79	0.90	0.89	0.93	0.88	0.88	0.91	0.92	0.93	0.92	0.94	1.00	
Y11	0.83	0.83	0.83	0.77	0.80	0.88	0.88	0.90	0.88	0.88	0.90	0.90	0.91	0.92	0.91	0.94	1.00

表 7 17 份材料基于 ISSR+SRAP 多态性的遗传相似系数矩阵

Table 7 Genetic similarity matrix based on ISSR + SRAP polymorphism in 17 materials

编号	G1	G2	G3	J2	J10	J11	J12	Y1	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11
G1	1.00																
G2	0.90	1.00															
G3	0.88	0.90	1.00														
J2	0.73	0.75	0.75	1.00													
J10	0.78	0.76	0.75	0.77	1.00												
J11	0.81	0.82	0.81	0.76	0.83	1.00											
J12	0.82	0.83	0.83	0.77	0.82	0.92	1.00										
Y1	0.81	0.82	0.82	0.78	0.81	0.92	0.93	1.00									
Y3	0.79	0.81	0.81	0.76	0.80	0.88	0.89	0.89	1.00								
Y4	0.79	0.78	0.79	0.77	0.81	0.85	0.87	0.88	0.85	1.00							
Y5	0.79	0.80	0.81	0.78	0.80	0.89	0.91	0.93	0.87	0.89	1.00						
Y6	0.81	0.83	0.81	0.77	0.81	0.90	0.92	0.91	0.90	0.88	0.92	1.00					
Y7	0.80	0.81	0.80	0.78	0.81	0.89	0.89	0.93	0.88	0.87	0.93	0.93	1.00				
Y8	0.81	0.80	0.79	0.77	0.83	0.88	0.88	0.90	0.86	0.88	0.90	0.91	0.92	1.00			
Y9	0.80	0.80	0.80	0.77	0.80	0.89	0.87	0.90	0.87	0.85	0.89	0.90	0.92	0.92	1.00		
Y10	0.82	0.82	0.82	0.77	0.81	0.88	0.88	0.91	0.86	0.86	0.90	0.91	0.92	0.91	0.95	1.00	
Y11	0.83	0.83	0.82	0.76	0.81	0.87	0.88	0.89	0.86	0.87	0.89	0.89	0.90	0.91	0.92	0.95	1.00

之间的遗传相似性最高，遗传距离最小，GS 值高达 0.95，说明亲缘关系最近；G1 与 G2，G3 与 G2，J11 与 J12 和 Y1，J12 与 Y1、Y5 及 Y6，除去 Y1 与 Y4，Y3 与 Y1、Y4、Y5、Y7、Y8、Y9、Y10 及 Y11，Y4 与 Y5、Y7、Y8、Y9、Y10 及 Y11，

其余从叶中纯化出来内生真菌两两之间，它们的 GS 值 (>0.90) 都很高，表明这些材料之间的遗传相似性高且亲缘关系较近；其余材料之间的 GS 值介于 0.7~0.9，则表明它们之间的遗传距离较前面的材料之间大，亲缘关系相对较远；J2 与 G2 之间

的 GS 值最小 (0.73), 遗传距离最大, 即两者之间的亲缘关系最远。

2.4 聚类分析

2.4.1 ISSR 位点聚类分析 利用 ISSR 遗传相似性矩阵按 UPGMA 方法进行聚类分析, 构建了各供试材料的亲缘关系图 (图 3)。聚类结果显示, GS 在 0.75~0.99。当 GS 为 0.75 时, 供试材料可聚为 2 个大类, J2 被单独聚为第 1 大类, 其余的材料都被聚为第 2 大类。在不同的遗传相似性水平上, 第 2 大类又可分为不同的亚类, 当 GS 为 0.86 时, 可分为 3 个亚类, G1、G2 和 G3 被聚为 1 个亚类, 除 Y1、Y3 和 Y4 之外, 其余从叶上分离纯化的内生真菌被聚为一个亚类, 剩下的 6 个材料又被聚为 1 个亚类。在 GS 为 0.99 时, 供试的 17 份材料可被全部区分开。由聚类结果显示, 几乎来源同一器官上材料间亲缘关系较近, 遗传相似度偏高, 被聚为一类, 如由此可见, ISSR 分子标记可以准确地确立各供试材料之间的遗传差异和亲缘关系。

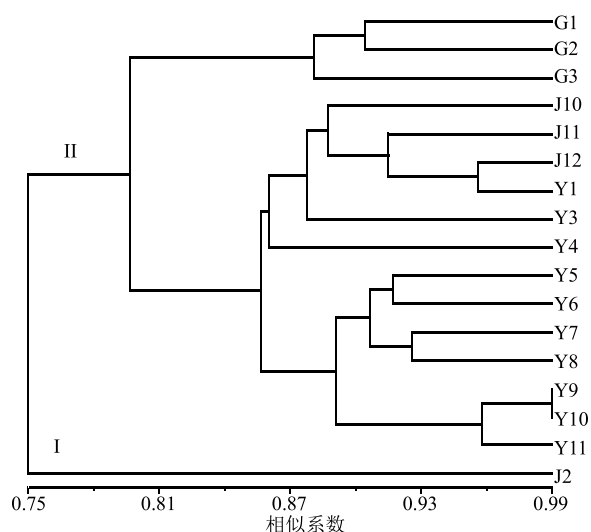


图 3 17 个材料的 ISSR 分子标记聚类结果

Fig. 3 Cluster result of 17 materials by ISSR markers

2.4.2 SRAP 位点聚类分析 利用 SRAP 遗传相似性矩阵按 UPGMA 方法进行聚类分析, 构建了各供试材料的亲缘关系图 (图 4)。聚类结果显示出与 ISSR 聚类结果存在一定的差异。遗传相似系数在 0.78~0.95。当遗传相似系数为 0.78 时, 供试材料可聚为 2 个大类, J2 与 J10 被聚为第 1 大类, 其余的材料都被聚为第 2 大类。同时在不同的遗传相似性水平上, 第 2 大类又可分为不同的亚类, 当遗传相似系数为 0.87 时, 可分为 2 个亚类, G1、G2

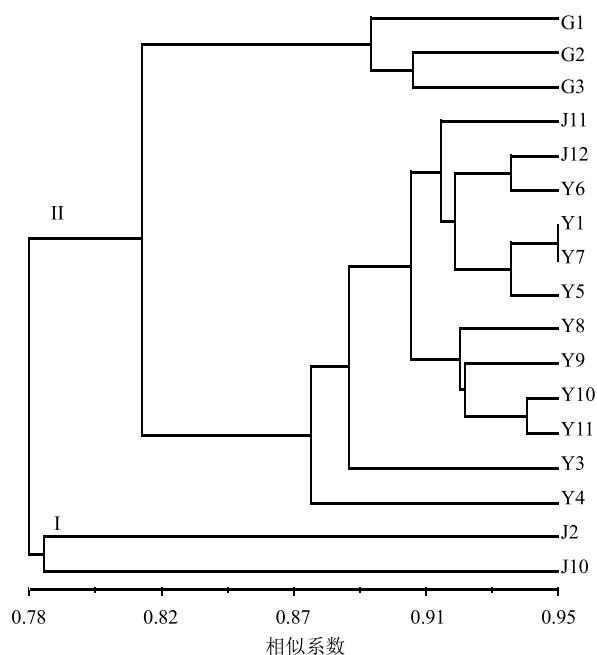


图 4 17 个材料的 SRAP 分子标记聚类结果

Fig. 4 Cluster result of 17 materials by SRAP markers

与 G3 被聚为 1 个亚类, 其余的材料都被聚为另一个亚类。在遗传相似性系数为 0.95 时, 供试的 17 份材料可被全部区分开。由聚类结果显示, 材料间亲缘关系较近, 遗传相似度较高, 被聚为一类, 由此可见, SRAP 分子标记也可以准确地确立各供试材料之间的遗传差异和亲缘关系。

2.4.3 ISSR+SRAP 位点聚类分析 利用 ISSR+SRAP 遗传相似性矩阵按 UPGMA 方法进行聚类分析, 构建了各供试材料的亲缘关系 (图 5)。聚类结

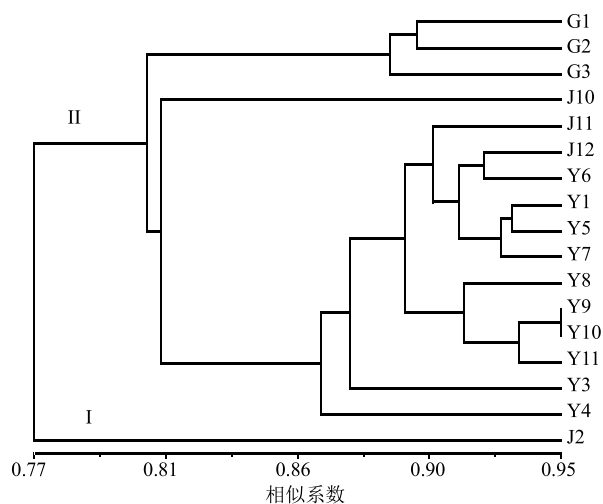


图 5 17 个材料的 ISSR+SRAP 分子标记聚类结果

Fig. 5 Cluster result of 17 materials by ISSR + SRAP markers

果显示,GS 在 0.77~0.95。在遗传相似系数为 0.77 时,被聚为 2 大类,2 大类中聚类在一起的材料与 ISSR 的聚类相同。但当遗传相似系数为 0.81 时,第 2 大类可被聚为 3 个亚类,与 ISSR 聚类结果不同,J10 被单独聚为一个亚类;G1、G2 与 G3 被聚为 1 个亚类,与 ISSR 和 SRAP 聚类结果相同,其余的材料都被聚为另一个亚类,其聚在一起的材料与 SRAP 的是相同的。在遗传相似性系数为 0.95 时,供试的 17 份材料可被全部区分开。由聚类结果显示,ISSR+SRAP 分子标记的聚类结果更能准确地确立各供试材料之间的遗传差异和亲缘关系。

3 讨论

物种遗传多样性的检测有表型、细胞、染色体和 DNA 分子等技术,但 DNA 分子检测是最为精确和活跃的领域,比如限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphic DNA, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (radom amplified polymorphic DNA, RAPD)、数目可变串联重复多态性(variable number of tandem repeats, VNTR)等^[21-23]。ISSR 与 SRAP 是新型的一类微卫星 DNA,在整个基因组不同位置都有分布,因其重复次数的不同或是重复程度的不相同而造成其每个座位多态性。故对它们的检测可实现对植物遗传多样性的检测,而且该检测具有灵敏、快速、准确、高效等优点^[15-16]。Ruma 等^[24]采用组织块法分别从 *Calophyllum apetalum* 和 *Garcinia morella* 中分离获得了 16 株 *Myrothecium* sp. 内生真菌,并用 RAPD 和 ISSR 技术分析了该属内生真菌的遗传多样性,结果表明,10 对 ISSR 引物共扩增出 189 条多态性条带。李蕊倩等^[25]建立了镰刀菌 ISSR 标记体系并对 27 株镰刀菌进行了遗传多样性分析,结果表明,选用的 11 个引物共扩增出 79 个 DNA 片段,其中多态性位点为 65 个(82.3%)。史云峰等^[21]采用 ISSR 技术分析了皱边石杉内生真菌资源遗传多样性,结果表明,10 对 ISSR 引物共扩增出 3 975 条清晰条带,多态性条带占 100%。本研究筛选出 27 条 ISSR 引物和 38 条 SRAP 引物对 17 份射干内生真菌 *F. proliferatum* 进行遗传多样性分析,结果显示,27 条 ISSR 引物共扩增出了 178 个条带,多态性条带占 63%;38 条 SRAP 引物能够扩增出 357 条稳定性较好的条带,具有稳定性差异的条带占 91%。由此可知,射干内生真菌 *F. proliferatum* 的遗传多样性

丰富,可为后期开发利用这些真菌资源提供丰富的遗传参考。

本研究采用了 ISSR 和 SRAP 2 种分子标记对从射干的根、茎、叶上分离纯化出来的 17 株内生真菌 *F. proliferatum* 进行了遗传差异及亲缘关系分析,研究结果显示他们之间的遗传差异较小($GS_{ISSR} = 0.73 \sim 0.99$, $GS_{SRAP} = 0.72 \sim 0.95$, $GS_{ISSR+SRAP} = 0.73 \sim 0.95$),与形态学和 ITS 序列分析的结果一致。聚类分析结果显示,这 17 株内生真菌被聚为 3 大类,其中,分离自根的 3 株内生真菌 *F. proliferatum* 聚为一类,分离自茎和叶的 *F. proliferatum* 聚集于另 2 类,说明基于 ISSR 和 SRAP 这 2 类分子标记可区分根与茎和叶中的 *F. proliferatum*。此外,就茎和叶分离的 14 株 *F. proliferatum* 而言,来自于同一部位的个别 *F. proliferatum* 遗传差异比来自不同部位的同种菌株的遗传差异大。如在 SRAP 或 ISSR+SRAP 的遗传相似性分析中显示,J12 与 Y6 的遗传相似性($GS=0.92$)较 J12 与 J10 ($GS=0.82$) 高。将他们进行聚类,J12 与 Y6 被聚在一起,而 J10 被单独聚为一类。本实验聚类结果还显示出,SRAP 和 ISSR+SRAP 在 0.95 水平,ISSR 在 0.99 水平,可将 17 株菌株完全分开。该研究结果可以看出采用分子标记技术比传统的方法更为有效,能够更为详细地鉴定出内生真菌 *F. proliferatum* 种内之间的微小差异。采用 ISSR、SRAP 以及 SSR+SRAP 进行聚类,结果显示出 SSR+SRAP 聚类后结果更精确,各材料之间差异性区别更显著,较单独采用两种分子标记聚类效果要好。如采用 ISSR 进行聚类,J10 与 J11、J12 及 Y1 被聚为一类,采用 SRAP 进行聚类,J10 与 J2 被聚为一类,而综合 SSR+SRAP 进行聚类 J10 被单独聚为一类。

目前,国内外 ISSR 和 SRAP 技术应用于内生真菌的相对较少。如皱边石杉内生真菌^[21]、紫杉内生真菌^[26]、产喜树碱喜树内生真菌^[27]等利用 ISSR 或 SRAP 技术进行了遗传多样性研究,都得到了比较理想的结果。本研究分别采用 ISSR、SRAP 分子标记及综合这 2 种技术分析射干内生真菌遗传多样性,研究结果显示了 ISSR 和 SRAP 2 种分子标记原理虽不同,但是射干内生真菌 *F. proliferatum* 基于 2 种标记的多态信息量相差不大($PIC_{ISSR}=0.70$ 、 $PIC_{SRAP}=0.73$)。相对而言,SRAP 标记检测的遗传多态性比率高于 ISSR 标记

($\text{Rate}_{\text{ISSR}} = 0.63$, $\text{Rate}_{\text{SRAP}} = 0.91$), 这可能是在 SRAP 分子标记区域中 *F. proliferatum* 基因组 DNA 的分子遗传多态率较高, 存在着更丰富微卫星变异所致的^[28-30]。同时研究结果进一步显示出这 2 种分子标记在射干内生真菌 *F. proliferatum* 的分子研究方面具有较好的应用前景。

总之, 本研究采用 ISSR 和 SRAP 标记技术对 17 株射干内生真菌 *F. proliferatum* 进行遗传多样性研究, 得出的结果较理想, 17 株内生真菌可以被清楚的鉴定出遗传差异和亲缘关系, 证实了这 2 种分子标记均可以被应用于该内生真菌的分子研究, 同时也丰富了 *F. proliferatum* 的遗传信息, 并且可以更真实地反映射干内生真菌 *F. proliferatum* 的遗传多样性。本实验研究结果也可进一步为研究射干与其内生真菌 *F. proliferatum* 两者相互作用的遗传机制以及今后 *F. proliferatum* 在分子遗传方面的研究提供重要的基础。

参考文献

- [1] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxonol and taxane production by *Taxomyces andreana*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [2] Li Y L, Xin X M, Chang Z Y, *et al.* The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba* are a potential source of natural antioxidants [J]. *Botanical Studies*, 2015, 56(1): 1-7.
- [3] 闵长莉, 汪学军, 赵梦凡, 等. 博落回内生真菌的分离及产血根碱菌株的筛选 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(22): 4288-4292.
- [4] Zhao J T, Fu Y J, Luo M. Endophytic fungi from pigeon pea *Cajanus cajan* (L.) Millsp. produce antioxidant cajanin stilbene acid [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(17): 4314-4318.
- [5] 王待娜, 钱冠兰, 李晓捷. 海带配子体克隆中一株镰刀菌的分离鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1491-1494.
- [6] 那可, 刘永双, 杨筱静, 等. 抗肿瘤活性化合物 1403C 的分离纯化 [J]. *中国医药工业杂志*, 2015, 46(2): 142-144.
- [7] Kumara P M, Zuehlke S, Priti V. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anticancer activity [J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 2012, 101(2): 323-329.
- [8] 毕晓颖, 徐文姬, 李卉. 鸢尾新品种 “Azure Pinwheel” 和 “Chic Leopard” [J]. *园艺学报*, 2013, 40(12): 2551-2552.
- [9] 秦民坚, 徐路珊, 田中俊红. 中国鸢尾属植物根茎中异黄酮类成分分布的初步研究及其系统学意义 [J]. *植物分类学报*, 2000, 38(4): 343-349.
- [10] 张良, 张玉奎, 戴荣继. 射干叶中黄酮碳苷类化合物的药理作用研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22: 728-730.
- [11] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [12] 邱天, 庞劲松. 小麦异源多倍体中亲本基因组相互作用产生快速基因组变异的 ISSR 标记分析 [J]. *东北师范大学学报*, 2011, 43(2): 124-128.
- [13] Beckma J S. Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement [J]. *Oxford Surveys Plant Mol Biol*, 1986, 3: 196-225.
- [14] 李培, 阙青敏, 王芳, 等. 红椿 SRAP 反应体系优化及引物筛选 [J]. *林业科学研究*, 2017, 30(1): 10-17.
- [15] 凌瑶, 任秀梅, 张新全, 等. 野生狗牙根种质资源遗传多样性 AFLP 与 SRAP 联合分析 [J]. *中国草地学报*, 2014, 6(2): 85-92.
- [16] 路浩, 李国中, 杨晓雯, 等. 甘肃棘豆内生真菌种群多样性 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(7): 1094-1099.
- [17] Nagaoka A, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeats Polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94(5): 597-602.
- [18] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP). a new marker system based on simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theo Appl Genet*, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [19] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, *et al.* Optimizing parental selection for genetic linkagemaps [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181-186.
- [20] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [21] 史云峰, 禹利君, 黄璜, 等. 皱边石杉内生真菌资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2266-2271.
- [22] 张述义, 李新风, 韦晓艳, 等. 33 株尖孢镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *生态学杂志*, 2013, 32(5): 1195-1202.
- [23] 陈振东, 袁高庆, 黎起秦, 等. 苦瓜枯萎病菌的鉴定及

- 其遗传多样性分析 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 36-45.
- [24] Ruma K, Sunil K, Kini K R. Genetic diversity and antimicrobial activity of endophytic *Myrothecium* spp. isolated from *Calophyllum apetalum* and *Garcinia morella* [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(11): 1533-1543.
- [25] 李蕊倩, 何 瑞, 张跃兵. 镰刀菌 ISSR 标记体系的建立及遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3139-3146.
- [26] Ren N, Liu J J, Yang D L, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker as a new method for identification of endophytic fungi from *Taxus* [J]. *World J Microb Biot*, 2012, 28(1): 215-221.
- [27] 李 霞, 刘佳佳, 陈建华. 产喜树碱喜树内生真菌的筛选及喜树内生真菌的 SRAP 分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(7): 60-64.
- [28] 赵柏霞, 高增贵, 庄敬华, 等. 瓜类保护地土壤镰孢菌种群及 UP-PCR 多样性分析 [J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 857-862.
- [29] 李新风, 张光明, 畅引东, 等. 21 株马特组镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(5): 1339-1344.
- [30] Aneja B, Yadav NR, Chawla V, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement [J]. *Mol Breed*, 2012, 30(4): 1635-1648.