

病效果,其中 JB₃ 效果最好,可将人参发病率控制在 5%左右。其次是 JB₁、JA₃、JA₄,其均能将人参的发病率控制在 10%左右。

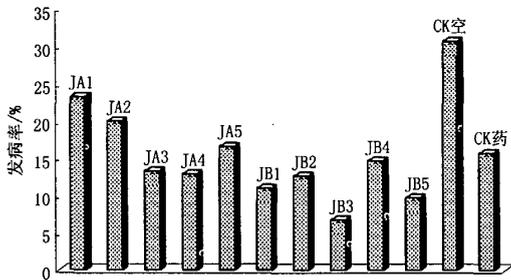


图 2 种播人参发病率

Fig. 2 Incidence rate of *P. ginseng* by semination

3 结论

综合木霉菌剂对人参种子出苗率和种苗成活率的影响及对人参根部病害的防治效果两方面看,蘸根法和浸种法优于沟施法。一种原因可能是这两种方法对人参种苗成活和种子萌发所需的水分起到补充的作用,另一种原因可能是木霉菌剂中的主效成分分生孢子能够更充分接触人参根部和种子外围,有利于其快速抢占定殖位点,减少了病原菌侵入的机会,降低了发病几率。沟施法的某些浓度如 GA₁、GB₂、GB₃降低了人参种苗的成活率,具体原因尚不

明确。本实验附带对木霉施入土壤后的种群数量进行了检测,结果发现木霉在土壤中可以长期存活,且回收木霉毒力无明显减弱趋势,故该两种木霉可进行更大面积的推广预试验,蘸根法使用木霉菌剂时,可用 Tv04-2 制剂稀释 5 000 倍, Th3080 制剂稀释 10 000 倍。浸种法使用木霉菌剂时,可用 Tv04-2 制剂和 Th3080 制剂均稀释 5 000 倍。

References:

[1] Li Z S, He Y Q, Xia X R. Inhibitory spectrum and partial biological traits of five *Trichoderma* isolates [J]. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2004 (6): 271.
 [2] Li H, Liu K Q, Wang G. Study on the characters of Chitinase produced by *Trichoderma* spp. with measuring reducing sugar [J]. *J Zhongkai Agric Coll* (仲恺农业技术学院学报), 2003, 16(1): 19.
 [3] Guo R F, Liu X G, Gao K X. Progress in biocontrol research with *Trichoderma* [J]. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 2002(11): 180.
 [4] Wei L, Liang Z H, Zeng L B, et al. Preliminary study on resistance induced by the fermentation metabolic product of *Trichoderma harzianum* T₂₋₁₈ against *Fusarium oxysporum* in cowpea seedling [J]. *J Hunan Agric Univ: Nat Sci* (湖南农业大学学报:自然科学版), 2004, 30(5): 443.
 [5] Ding W L, Cheng H Z, Chen J. Research on preventing the medicinal plant disease with *Trichoderma harzianum* preparation [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(8): 24.
 [6] Ding W L, Cheng H Z, Zhang G Z, et al. Effect study of *Trichoderma* on *Panax Rhizoctonia* disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(2): 91.

川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定

罗 群¹, 马丹炜^{1,2*}, 王跃华³

(1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610066; 2. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064; 3. 成都大学 生物工程系, 四川 成都 610081)

摘要:目的 应用 ISSR 标记技术分析川乌遗传多样性。方法 对江油附子和 9 个野生乌头居进行了 ISSR 分析, 探索川乌各居群间的遗传多样性。结果 8 个引物共扩增出 98 条带。其中 68 条具有多态性, 多态位点百分率为 69.39%; 观测等位基因数 (N_a) 为 1.693 9, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.371 5, Nei's 基因多样性指数为 0.230 8, Shannon 信息指数 (I) 为 0.353 0; 用 ISSR 855 引物能够区分川乌的 10 个供试居群。结论 ISSR 标记适合于构建川乌的 DNA 指纹图谱、品种鉴定和遗传多样性分析。

关键词: 川乌; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)10-1554-04

ISSR Identification of genetic diversity in *Aconitum carmichaeli*

LUO Qun¹, MA Dan-wei^{1,2}, WANG Yue-hua³

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China; 2. College of Life Science, Sichuan Uni-

收稿日期: 2005-12-26

基金项目: 四川省教育厅重点项目 (2003A084)

作者简介: 罗 群 (1979-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物遗传多样性及细胞工程。

* 通讯作者 马丹炜 Tel: 13709018761 E-mail: danwei10ma@yahoo.com.cn

versity, Chengdu 610064, China; 3. Department of Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610081, China)

Abstract: Objective ISSR Identification of genetic diversity in *Aconitum carmichaeli* by ISSR marker technique. **Methods** Genetic diversity between Jiangyou *Radix Aconiti Lateralis Preparata* and nine wild *A. carmichaeli* populations was determined by ISSR technique. **Results** Eight primers were selected to produce highly reproducible ISSR bands. Among 98 amplified bands, 68 showed polymorphism, the percentage of polymorphic bands (PPB) reached to 69.39%. Observed number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity index (H), and Shannon information index (I) were 1.693 9, 1.371 5, 0.230 8, and 0.353 0, respectively. A DNA profile was discovered with a single primer, ISSR 855, in which each of ten tested populations had its unique patterns and was distinguished from each other. **Conclusion** ISSR Method is suitable for DNA fingerprinting, identification, and genetic diversity analysis of *A. carmichaeli*.

Key words: *Aconitum carmichaeli* Debx.; ISSR; genetic diversity

DNA 分子标记为植物的遗传和物理图谱的建立、基因的定位与克隆、数量性状位点的遗传分析、遗传多样性评估、物种起源和分子标记辅助育种等遗传学研究提供了有价值的工具^[1]。在众多的 DNA 分子标记中,简单重复间序列(inter-simple sequence repeats, ISSR)在植物遗传多样性研究中获得了成功。ISSR DNA 标记技术是由 Zietkiewicz 提出的,该技术检测的是两个 SSR 之间的一段短 DNA 序列上的多态性^[2]。ISSR 技术所用的 PCR 引物长度在 20 个核苷酸左右,因此可以采用与常规 PCR 相同的反应条件,稳定性比 RAPD 好。近年来,ISSR 标记技术已应用于水稻、玉米、大豆、大蒜等农作物和苹果、李等果树的研究,在中药中 ISSR 标记研究很少,国内仅少量报道^[3~5]。

川乌 *Aconitum carmichaeli* Debx. 为毛茛科乌头属植物,附子 *Radix Aconiti Lateralis Preparata* 为栽培种川乌的侧根,是“回阳救逆”要药,临床应用范围不断拓宽,多用于传统的饮片配方,近年来也用作制药工业原料。传统的种植地主要集中在四川江油,为公认的地道产地。附子产品大量销往国内市场、出口东南亚和日本等国,附子已经成为江油市重要的经济作物。国内外市场对附子的品质、纯度和道地性具有较高的要求。目前市场上附子产品来源比较复杂,优劣品种混杂,采用传统的形态特征和系谱来源对其分类研究和遗传分析较难。为准确鉴定和使用,克服传统鉴定方法不易区分品种的不足,为其新品种选育和育种提供分子依据,本实验采用 ISSR 标记鉴定了江油附子与采自四川的青川县、平武县、都江堰市、峨眉山、瓦屋山及九龙县等地的野生居群的种质多样性。

1 材料和方法

1.1 供试材料:乌头野生居群采自都江堰(DJY)、瓦屋山(WWS)、峨眉山太子坪(TZP)、峨眉山中锋寺(ZFS)、平武(PW)、九龙县(JL)、青川林场(LC)、青川大坝(DB)、青川陈家坝(CJB),栽培种采自江油(JY),野外采集材料由四川师范大学生命科学学院马丹炜副教授鉴定,凭证标本保存在四川师范大学生命科学学院细胞工程研究室;取新鲜叶片,用硅胶迅速干燥后带回实验室,储于-70℃冰箱保存。

1.2 DNA 的提取:参照邹喻萃等的 CTAB 法^[6]。

1.3 PCR 反应:ISSR 引物购自哥伦比亚大学(UBC 9#)。筛选出条带清晰、反应稳定的引物进行 ISSR 标记分析。反应总体积为 20 μL,其中含 DNA 模板 50 ng, dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 200 μmol/L,引物 0.2 μmol/L, 10×PCR 缓冲液 2 μL, 1 U *rTaq* 酶。PCR 反应程序为:94℃, 5 min; 94℃, 30 s; 48℃, 45 s; 72℃, 2 min; 45 个循环; 72℃, 7 min。反应产物使用 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相并记录结果。

1.4 数据处理与统计分析:每一条引物均重复扩增、电泳 3 次,选取稳定清晰的条带进行统计分析。电泳图谱的每条带(DNA 片段),均为一个分子标记,代表一个引物的结合位点。根据分子标记的迁移率及其有无统计所有的二元数据;有带(显性)记为 1,无带(隐性)记为 0,强带和弱带的赋值均为 1。采用 POPGEN32 软件,计算多态性位点百分率(PPB, the percentage of polymorphic bands)、观测等位基因数(observed number of alleles) ($N_a = \sum_{i=1}^n A_i/n$)、有效等位基因数(effective number of alleles) ($N_e = \sum_{i=1}^n [1/\sum_{j=1}^m q_j^2]/n$)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene

diversity) ($H = \sum_{i=1}^n [1 / \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}] / n$)、Shannon 信息指数 (Shannon information index) ($I = \sum_k \sum_i x_i y_i =$

$\sqrt{\sum_k \sum_i x_i^2 \cdot \sum_k \sum_i y_i^2}$); 根据 Nei's 距离 (GD), 用 UPG-

MA 法进行系统聚类分析, 构建分子进化系统树。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性: 从 63 条 ISSR 引物筛选出 8 条 ISSR 引物用于 PCR 扩增, 扩增条带的相对分子质量从 200~1 000 bp 不等 (图 1)。共扩增出 98 条带, 其中具有多态性的条带数为 68 条, 多态性位点百分率为 69.39% (表 1), 并由 POPGEN32 软件分析得出: 观测等位基因数 (N_a) 为 1.693 9, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.371 5, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.230 8, Shannon 信息指数 (I) 为 0.353 0。

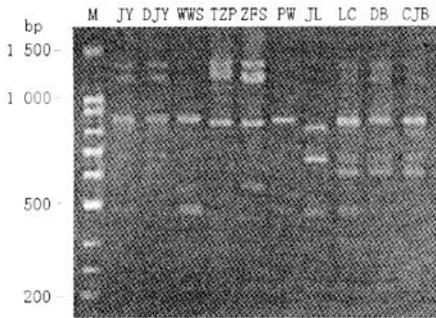


图 1 引物 855 对 10 个川乌居群的扩增特征图谱

Fig. 1 ISSR Profile of ten *A. Carmichaeli* populations generated by Primer 855

表 1 ISSR 引物及其碱基序列和多态性分析

Table 1 ISSR Primer sequences and analysis of ISSR-generated banding patterns

引物	碱基序列 (5'~3')	扩增带数/条	多态性条带/条	多态性位点数/%
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	14	12	85.7
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	11	8	72.7
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	12	4	33.3
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	16	12	75
849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	11	7	63.6
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	12	8	66.7
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	11	11	100
859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	11	6	54.5
总数		98	68	69.39

R=(A, G); Y=(C, T)

根据实验结果获得了 10 个川乌居群的遗传一致度和遗传距离 (表 2)。青川大坝和青川陈家坝川乌居群间遗传一致度最大 (0.959); 江油附子和都江堰川乌居群间的遗传一致度次之 (0.908), 青川大坝和峨眉太子坪、峨眉中锋寺、九龙县川乌居群间的遗传一致度最小, 均为 0.633, 平均遗传一致度为 0.744, 平均遗传距离为 0.302。

2.2 ISSR 特征图谱的建立: 利用筛选得到的 8 条 ISSR 引物分别对供试材料进行 PCR 扩增, 建立了相应的 DNA 指纹图谱, 其中从 855 引物能够区分川乌的 10 个供试居群 (图 1), 该引物扩增的 10 个川乌居群 DNA 电泳图谱为鉴定品种的真实性及品种间的差异提供了科学依据。

2.3 川乌的 ISSR 聚类分析: 为了进一步表明 10 个供试居群间的遗传关系, 利用 Nei's 遗传距离采用

表 2 10 个川乌居群的一致度和遗传距离

Table 2 Nei's Genetic identity and genetic distance for ten *A. Carmichaeli* populations

居群	JY	DJY	WWS	TZP	ZFS	PW	JL	LC	DB	CJB
JY		0.908	0.776	0.694	0.684	0.735	0.755	0.827	0.694	0.694
DJY	0.096		0.786	0.704	0.755	0.827	0.827	0.878	0.745	0.745
WWS	0.254	0.241		0.714	0.684	0.796	0.735	0.745	0.714	0.694
TZP	0.366	0.351	0.337		0.827	0.694	0.653	0.704	0.633	0.633
ZFS	0.380	0.281	0.380	0.191		0.765	0.704	0.735	0.663	0.663
PW	0.308	0.191	0.228	0.366	0.268		0.857	0.847	0.714	0.674
JL	0.281	0.191	0.308	0.426	0.351	0.154		0.847	0.633	0.653
LC	0.191	0.131	0.295	0.351	0.308	0.166	0.166		0.745	0.745
DB	0.366	0.295	0.337	0.458	0.411	0.337	0.458	0.295		0.959
CJB	0.366	0.295	0.366	0.458	0.411	0.395	0.426	0.295	0.042	

非加权算术平均法 (UPGMA) 进行聚类 (图 2), 所有居群明显划分为 3 组。第 1 组含有 6 个居群, 包括江油附子、都江堰、青川林场、平武、九龙县及瓦屋山等地的居群; 第二组包括峨眉山太子坪和峨眉山中锋寺的居群; 第三组包括青川大坝居群和青川陈家坝居群。

3 讨论

3.1 川乌居群的遗传多样性: 从 10 个居群的遗传一致度及聚类结果表明, 川乌居群间遗传一致度从 0.633~0.908, 遗传一致度较高, 与形态学分类结果一致, 表明原产四川的药材川乌在原位、迁移地或栽培地不同生态型的分化较少。

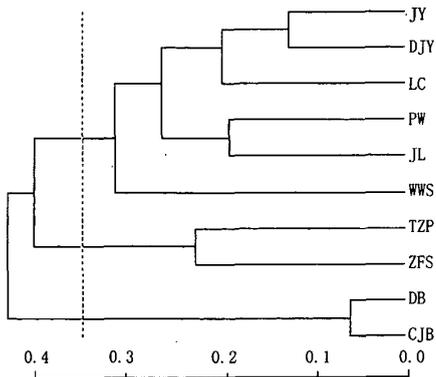


图 2 10 个川乌居群间的 ISSR 聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of ISSR analysis for ten *A. Carmichaelii* populations based on Nei's genetic distance

10 个川乌居群间的遗传多样性水平存在较大差异,青川大坝居群和青川陈家坝居群间遗传一致度最大,江油附子和都江堰居群间的遗传一致度次之,而青川大坝和峨眉太子坪、峨眉中锋寺、九龙居群间的遗传一致度最低。树状聚类分析图中,青川大坝和青川陈家坝居群聚在了第三组,峨眉太子坪和峨眉中锋寺的居群聚在了第二组,表明地理分布范围是决定植物遗传多样性的主要因素之一^[7],地理距离小的居群间趋向于更高的遗传一致度,遗传多样性水平较低,宽分布区的种趋向于具有更高的遗传多样性水平。同样青川林场居群与青川大坝居群和陈家坝居群相比,较其他两地的居群有较大的遗传差异,可能与林场的海拔高度较大坝和陈家坝高有关。

3.2 江油附子与野生川乌居群间的遗传差异:江油附子与都江堰居群间的遗传一致度最高;与峨眉中锋寺居群遗传一致度最小,与峨眉太子坪、青川大坝、青川陈家坝居群间的遗传一致度次之,如果长期用同样的居群进行栽培,川乌的品质将会逐渐下降。因此,对峨眉中锋寺、峨眉太子坪、青川大坝、青川陈家坝四个产地川乌的有效化学成分进行比较分析,选育优质药材居群进行栽培和组织快繁,将能够为川乌的品种选育、栽培和杂交复壮提供丰富的种质资源。

3.3 ISSR 标记:ISSR 通常为显性标记,呈孟德尔式遗传,具有很好的稳定性和多态性^[8],且一套 IS-

SR 引物可以在多种植物中通用,提高了其利用率,故在遗传关系研究方面有着广阔的应用前景。周延清等^[5]用一个 ISSR 引物建立了 10 个怀区地黄样品的 DNA 指纹图谱并且能将其彼此区分出来。姚明哲等由两个 ISSR 引物扩增的指纹图谱可清楚区分 6 个不同品种的茶树^[9]。本研究也揭示了 ISSR 标记的多态性,在 10 个供试川乌居群中,用 8 个 ISSR 引物共扩增出 98 条带,多态性比率为 69.39%,仅用一条引物 855 就可以鉴别出本实验所用的 10 个川乌居群,具有高效、准确的特点。

总之,ISSR 技术是一种鉴定川乌种质的有效且实用的工具,能够检测到较高的多态性。用它所得到的多态带对栽培附子过程中生产育种组合亲本,对杜绝生产中假冒伪劣品种的危害,对于大力发展我国中药附子资源,促进中药附子的现代化生产皆具有重要意义。

References:

- [1] Zhao S Q, Wu W H. DNA Molecular markers and mapping [J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通报), 2000, 6(1): 1-4.
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20(2): 176-183.
- [3] Sun Y, Li J P, Jin Y C, et al. ISSR Identification between *Schisandra chinensis* Baill and *Schisandra sphenanthera* Rehd et Wils [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2003, 31(1): 29-30.
- [4] Qiu Y X, Fu C X, Wu F J, et al. Analysis of population genetic structure and molecular identification of *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum* with ISSR marker [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 598-603.
- [5] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. ISSR Identification of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* in Huai zone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 257-261.
- [6] Zou Y P, Ge S, Wang X D. *Molecular Marker for Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [7] Jian S G, Tang T, Zhong Y, et al. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Austrillia [J]. *Aquat Bot*, 2004, 79(1): 75-86.
- [8] Liang M S, Zeng Y, Zhou X, et al. Genetic markers and their applications in identifying crop cultivars [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2001, 18(3): 257-265.
- [9] Yao M Z, Huang H T, Yu J Z, et al. Analysis on applicability of ISSR in molecular identification and relationship investigation of tea cultivars [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), 2005, 25(2): 153-157.