

综合以上结果,从试管苗的生长状况来看,1/2MS培养基优于MS培养基,MS培养基中的无机盐如钾盐、铵盐和硝酸盐量均较高,微量元素种类较全,浓度也较高,是植物组织培养中常用的基本培养基。可见,怀地黄试管苗对大量元素的需求不高,1/2MS中大量元素的量足以满足其生长的需要,因此,可以用1/2MS培养基取代MS培养基^[4]。

添加蒸馏水明显优于添加自来水,试管苗在添加自来水的培养基中的生长状况远不如添加蒸馏水的。这一点与张春华等^[5]对马铃薯、菊花和满天星进行规模化生产时的研究结果不同。主要原因可能是本地区(新乡)自来水水质较硬(Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 量较高),pH值偏高,在配制过程中虽已对培养基的pH值进行调定,但仍比用蒸馏水配制的附加等量冷凝脂的培养基硬度大。由此认为,培养基过硬也可对试管苗的生长造成不利影响。所以在怀地黄试管苗的快速繁殖中,不提倡使用自来水。可以考虑将自来水煮沸以降低其中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的离子浓度^[6],从而用自来水代替蒸馏水。

在大规模生产时,为了降低成本,常采用白砂糖作为碳源代替蔗糖^[7~9],本实验中两种碳源除叶绿素外对试管苗的生长影响不大,因此,白砂糖可以取代蔗糖。

3 结论

本实验的结果表明,在怀地黄试管苗的快速繁殖过程中,1/2MS培养基优于MS培养基,白砂糖

与蔗糖差别不大,而自来水不利于试管苗的生长。因此,在怀地黄的规模化生产中,可以1/2MS培养基取代MS培养基,以市售白砂糖取代分析纯蔗糖。从生产成本看,每株试管苗可降低成本约0.05元。由此可见,在怀地黄试管苗的生产中,适当调节培养基成分,可以降低生产成本。

References:

- [1] Chen M Y, Liang Z S, Wang Z Z, et al. Tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24(6): 1083-1087.
- [2] Kodym Z, Arias F J. Low-cost alternatives for the micropagation of banana [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 66: 67-71.
- [3] Gong F S, Zhang J B. *Plant Physiology Experiment* (植物生理实验) [M]. Beijing: China Meteorological Press, 1995.
- [4] Pang S M, Fang G N. The optimize of potato virus-free plantlet's medium for rapid propagation and low-cost [J]. *J Henan Agric Sci* (河南农业科学), 2004 (12): 59-61.
- [5] Zhang C H, Lian M L, Piao X C. Lowercost of culture medium during tissue culture [J]. *J Agric Sci Yanbian Univ* (延边大学农学报), 2005, 27(4): 261-264.
- [6] Bai Y J, Li X Z, He Y X, et al. Factorizing production of high-quality and low-cost of potato virus-free plantlets [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2001, 17(2): 82-83.
- [7] Puchooa D, Erigadoo P, Wah Y F W C. A comparison between analytical sucrose and table sugar in the tissue culture of *Saintpaulia ionantha* [J]. *Revue Agricole et Sucriere de l' Ile Maurice*, 1997, 76(2): 7-16.
- [8] Li J, Li C G, Tian X K. The study of decreasing the factorizing cost of cherry plantlets [J]. *Hebei Fruits* (河北果树), 2004(1): 7-8.
- [9] Sharma T R, Singh B M. Simple and cost effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*) Indian [J]. *Agric Sci*, 1995, 65(7): 506-508.

人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析

李 靖¹, 程 舟^{1*}, 杨晓伶¹, 李 珊¹, 顾然其¹, 万树文², 张文驹³

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 2. 上海雷允上药业有限公司, 上海 200002; 3. 教育部生物多样性与生态工程重点实验室, 复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所, 上海 200433)

摘 要:目的 探讨人参农家类型的遗传多样性和亲缘关系,为人参的栽培和选育种提供遗传学依据。方法 采用 ISSR 分子标记分析 5 种人参农家类型 7 个居群 120 个样本的遗传多样性。结果 人参农家类型有较丰富的遗传多样性,平均多态位点百分率为 48.85%;不同农家类型的遗传多样性水平有差异,和其他农家类型相比,长脖和竹节芦的遗传变异较小,且两者之间的相似性系数高达 97%;不同产地的同一人参农家类型间也存在很大的遗传差异。结论 研究表明人参农家类型的遗传差异主要存在于各类型内部,而且可能更多地存在于同一类型的不同居群内部。为促进人参新品种的选育,有必要在现有的栽培群体中补充不同产地的同一类型的种质资源。

关键词:人参;农家类型;遗传多样性;ISSR

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1392-04

收稿日期:2006-12-15

基金项目:上海市科委中药现代化专项(03DZ19547,04DZ19834)

作者简介:李 靖(1981—),男,湖北松滋人,在读研究生,从事中药材资源保护及利用研究。

* 通讯作者 程 舟 Tel:(021)65985185 E-mail:chengzhou@mail.tongji.edu.cn

ISSR Analysis on genetic diversity of *Panax ginseng* landracesLI Jing¹, CHENG Zhou¹, YANG Xiao-ling¹, LI Shan¹, GU Ran-qi¹, WAN Shu-wen², ZHANG Wen-ju³

(1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Lei-yun-shang

Medicine Co., Ltd., Shanghai 200002, China; 3. Key Laboratory of Biodiversity and Ecological

Engineering, Ministry of Education, Institute of Biodiversity Science, School

of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To discuss the genetic diversity and relationship of *Panax ginseng* landraces and provide genetic references for ginseng cultivation, selection and breeding. **Methods** The genetic diversity of 120 individuals from seven populations, representing five *P. ginseng* landraces, was analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Results** *P. ginseng* landraces held higher genetic diversity and the average percentage of polymorphic loci was 48.85%. Genetic diversity levels were very different among various landraces. The landraces of Zhujielu and Changbo showed relatively low genetic variation as compared with the others and their similarity coefficient was up to 97%. A large genetic variation existed in the same landraces but cultivated in different habitats. **Conclusion** This study indicates that the large genetic variations mainly exists within each landrace, but even more variations might exist within different populations from a same race. For promoting the breeding and selecting of *P. ginseng* varieties, it is necessary to supply germplasm of the same race from different habitats to the currently cultivated populations.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; landrace; genetic diversity; ISSR

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 系五加科 (Araliaceae) 多年生植物, 栽培的又称“园参”, 是我国著名的传统中药材^[1]。人参在我国栽培历史悠久, 经过长期的自然变异和人工选育, 人参栽培群体中已形成一些性状稳定的变异类型, 如大马牙、二马牙、长脖、圆芦等, 常被称为农家类型^[2]。这些人参农家类型在各地的栽培群体中混杂分布, 对人参的选育种工作和 GAP 生产均有一定的影响。研究人参不同农家类型的遗传差异、多样性水平及亲缘关系对提高人参的栽培及选育种水平具有重要意义。为此, 赵寿经等^[3]对人参农家类型的农艺性状进行了遗传分析; 马小军等应用 RAPD 和 AFLP 等方法对野山参与栽培参、栽培参不同栽培群体、不同农家类型间的遗传关系进行了系统的研究^[4,5]; 邵爱娟等^[6]用 RAPD 法分析了人参农家类型大马牙和二马牙不同品系间的遗传关系。而对人参各农家类型内的遗传变异尚缺乏了解。

简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, ISSR)^[7] 是利用生物基因组中常出现的简单序列重复 SSR 设计引物, 检测多态性的一种分子标记。ISSR 分子标记技术具有操作简单, 无需预先知道 DNA 序列, 比 RAPD 标记更为灵敏、稳定且实验重现性好等优点, 已成功应用于如罗汉果^[8]、水稻^[9]、山药^[10]等植物的遗传多样性研究, 但

还未见该方法用于人参种质资源研究的报道。本研究采用 ISSR 方法分析 5 种人参农家类型的遗传多样性, 明确各农家类型内和类型间的遗传差异、多样性水平及各居群间的亲缘关系, 为人参的栽培生产和育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料: 实验材料均为人参干燥根, 包括 5 个农家类型的 7 个居群。大马牙采自吉林省通化市, 二马牙分别采自吉林省通化市、辽宁省新宾县和集安市, 圆芦、长脖和竹节芦均采自辽宁省集安市。除长脖和竹节芦采集 10 个个体外, 其余 5 个居群均采集 20 个个体。

1.2 基因组 DNA 的提取: 采用改进的高盐 SDS 法^[11]提取人参总 DNA。

1.3 ISSR 引物筛选及 PCR 扩增: 从 100 条 ISSR 引物 [The University of British Columbia (UBC) SSR Primer (RAPD) Synthesis Project Oligonucleotide Set 100/9] 中筛选出 6 个扩增条带清晰、多态性带明显、反应稳定的引物用于全部 120 份 DNA 样品的扩增 (表 1)。ISSR-PCR 反应体系经优化确定为 20 μ L 的 PCR 反应液内含: 2 mmol/L $MgCl_2$ 、0.25 mmol/L dNTPs、0.2 μ mol/L 引物、10 ng 模板、1 $\times$ buffer 和 0.75 U Ex TaqDNA 聚合酶 (TaKaRa)。扩增条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 40 个循

环;94℃变性45 s,51.5~54℃退火45 s(各引物的退火温度见表1),72℃延伸45 s;最后72℃延伸10 min。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳分离(以100 V恒压电泳60 min),以100 bp DNA Ladder Plus 作为相对分子质量标准,用1 μg/mL 溴化乙锭染色后于紫外成像仪中拍照、观察、记录并保存电泳图片。

表1 ISSR 引物及其对人参农家类型120份样品的PCR 扩增结果

Table 1 Number of fragment amplified with ISSR primers for 120 individuals of *P. ginseng* landraces

引物	序列	退火温度/℃	总条带数	多态性条带数	多态率/%
807	AGAGAGAGAGAGAGT	54	14	13	92.9
826	ACACACACACACACC	54	16	16	100
842	GAGAGAGAGAGAGAYG	51.5	16	16	100
856	ACACACACACACACYA	52	15	15	100
859	TGTGTGTGTGTGTGRC	52	11	11	100
873	GACAGACAGACAGACA	52	21	21	100
总计			93	92	98.9

1.4 统计方法:根据ISSR扩增条带的有无分别用“1”和“0”表示,构建原始数据表征矩阵。用Popgene32软件计算遗传多样性参数和相似性系数^[12],根据相似性系数采用NTSYS-pc Numerical Taxonomy System 分析软件进行UPGMA法聚类分析并绘制系统树状图^[13]。

2 结果

2.1 人参农家类型的遗传多样性分析:从100条ISSR引物中筛选出扩增条带清晰、重现性好的6条引物,以5个人参农家类型的7居群共计120个样品的扩增结果见表1和图1。5个人参农家类型的ISSR指纹图谱在类型间和类型(居群)内存在差异。6条引物共扩增出93条重现性高、清晰的条带,多态性条带92条,多态率为98.9%。平均每个引物扩增条带数为15.5条。人参农家类型的Shannon多样性指数在0.185 9~0.279 8,平均为0.236 2,其中以长脖(CB)和竹节芦(ZJ)最小(表2)。人参各农家类型的等位基因数和有效等位基因数也有相同的变化趋势。人参农家类型居群内多态性位点数从39(CB)至52(XR 新宾二马牙)不等,各居群的多态位点数平均为45,各居群多态位点百分率平均为48.85%(表2)。居群内基因多样性占总的基因多样性的68.14%,而居群(类群)间的基因多样性仅占总的基因多样性的31.86%。居群间基因流为1.069 1,表明各居群间存在一定的基因交流。

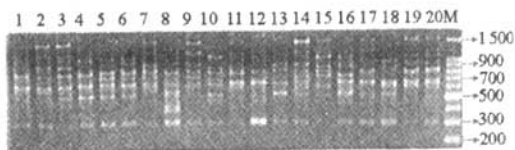


图1 新宾二马牙居群(XR 20个个体)的ISSR 指纹图谱(引物873)

Fig. 1 ISSR Banding pattern of ermaya population from Xinbin, Liaoning (XR, 20 individuals, primer 873)

表2 人参农家类型7个居群的遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity parameters of seven populations of *P. ginseng* landraces

居群*	Shannon 指数	等位基因数	有效等位基因数	多态位点数	多态位点百分率/%
XR	0.268 6	1.559 1	1.297 2	52	55.91
TR	0.238 3	1.494 6	1.267 8	46	49.46
YL	0.244 5	1.483 9	1.276 7	45	48.39
JR	0.236 3	1.483 9	1.265 4	45	48.39
TD	0.279 8	1.548 4	1.323 2	51	54.84
ZJ	0.200 2	1.430 1	1.215 5	40	43.01
CB	0.185 9	1.419 4	1.192 1	39	41.94
平均	0.236 2	1.488 5	1.262 6	45	48.85

* XR:新宾二马牙;TR:通化二马牙;YL:圆芦;JR:集安二马牙;TD:通化大马牙;ZJ:竹节芦;CB:长脖

* XR: Xinbin Ermaya; TR: Tonghua Ermaya; YL: Yuanlu; JR: Ji'an Ermaya; TD: Tonghua Damaya; ZJ: Zhujielu; CB: Changbo

2.2 人参农家类型的遗传聚类分析:从基于ISSR数据构建的人参农家类型7居群间的遗传关系聚类图中可以看出(图2),人参农家类型大致可分为两个组:二马牙(除集安样品)聚为一组,在相似性系数0.88的水平上和其他类型的人参分开;其余类型的人参聚在另一组,组中竹节芦、长脖和圆芦又可分为一个小分支,大马牙和集安二马牙聚成另一小分支,其中竹节芦与长脖相似性系数最高,达到97%。

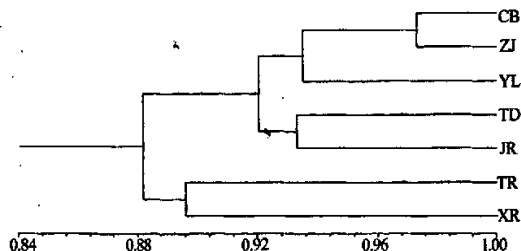


图2 基于ISSR数据用UPGMA法构建的人参农家类型的聚类分析图(居群编号同表2)

Fig. 2 UPGMA Dendrogram of genetic relationships of *P. ginseng* landraces based on similarity coefficient from 93 ISSR fragments (population codes are same as Table 2)

3 讨论

人参为典型的异花授粉多年生草本植物^[14],人参栽培群体为存在着各种变异的混杂群体^[15]。对5个人参农家类型7个居群的120个个体的ISSR分析也证明了人参农家类型有较丰富的遗传多样性,平均多态位点百分率为48.85%。同时人参农家类型的遗传多样性主要存在于各类型(居群)内,而类型(居群)间的遗传变异相对较小。该结果与国内研究者采用RAPD、AFLP法研究人参不同农家类型或不同栽培品系所得的研究结果相吻合^[5,6]。因此,要获得鉴别人参农家类型的特异性分子标记有难度。

人参农家类型是由野山参驯化后经由人工选育而来的,一般是根据其根的形态特征来划分的。虽然目前人参农家类型已经形成了各自相对稳定的性状特征,但不同农家类型的遗传多样性水平是不同的。有报道认为长脖类型具有一定的特殊性,其内部变异量最高。基于本研究的ISSR数据分析,长脖和竹节芦两个农家类型的遗传多样性指数较低,表明这两个类型的遗传变异较小,可能和它们比较容易区分的形态特征有关。同时长脖和竹节芦类型之间的遗传相似性系数高达97%,说明这两个类型的人参在分子水平上没有多大的差异,而且在聚类树状图上和其他农家类型的遗传关系较远。

人参农家类型的聚类分析结果中如果将通化二马牙和新宾二马牙两个居群排除在外讨论,那么5个农家类型的遗传关系与以往的相关研究报道一致,即二马牙与大马牙、长脖与圆芦之间的关系较近^[16]。但本研究中同为二马牙的不同产地的3个居群,集安二马牙、通化二马牙和新宾二马牙却有着相对较远的遗传关系。马小军等^[2]认为遗传因素在人参形态上的作用可能小于环境因素。同时鉴于人参的异花授粉特性、各地生长环境和种质来源及参农的栽种习惯等因素,可以认为人参农家类型的遗传差异不仅主要存在于各类型内部,可能更多地存在于同一类型的不同居群内部。从居群间基因流来看,各居群间的基因交流偏少。因此,在人参选育种过程中,除以个体选择为主外,有必要在现有的栽培群体中补充不同产地的同一类型的种质资源。

致谢:辽宁省新宾满族自治县药材公司和吉林省集安市医药药材公司为本研究的样品采集提供的大力支持。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I 2005.
- [2] Ma X J, Wang X Q, Xiao P G, et al. Research progress of idioplasm resources in domestic ginseng [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35(5): 289-292.
- [3] Zhao S J, Zhou J C. Discussion to the difference of mainly quantitative characteristics in seedling stage and the relationship in different ginsengs [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1993, 16(5): 3-5.
- [4] Ma X J, Wang X Q, Sun S X. A study on fingerprintings of wild mountain ginseng (*Panax ginseng*) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(4): 312-316.
- [5] Ma X J, Wang X Q, Xu S X, et al. RAPD Variation within and among populations of ginseng cultivars [J]. *Acta Bot Sinica* (植物学报), 2000, 42(6): 587-590.
- [6] Shao A J, Li X, Huang L Q, et al. Genetic analysis of cultivated ginseng population with assistance of RAPD technology [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 29(11): 1033-1036.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genome*, 1994, 20: 178-183.
- [8] Zhou J Y, Tang S Q, Xiang W S, et al. Genetic diversity of cultivated Luohanguo (*Siratia grosvenorii*) based on ISSR marker [J]. *Guihai* (广西植物), 2005, 25(5): 431-436.
- [9] He Y Q, Zhang Y, Sun M, et al. Studies on relationship between cultivated and wild rice using ISSR markers [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2001, 9(2): 123-127.
- [10] Zhou Y Q, Jin J Z, Li Z Y, et al. Genetic diversity of Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) detected by ISSR markers [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 2005, 38(4): 324-330.
- [11] Wang Q, Cheng Z, Zhang L, et al. Distinguishing wild *Panax ginseng* from cultivated *Panax ginseng* based on directed amplification of length polymorphism (DALP) analysis [J]. *J Fudan Univ: Nat Sci* (复旦学报: 自然科学版), 2004, 43(6): 1030-1034.
- [12] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. *POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis* [M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.
- [13] Rohlf F J. *NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0)* [M]. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc., 1998.
- [14] Tan S X. Preliminary observation of biological character on ginseng efflorescence [J]. *Spec Wild Econo Anim Plant Res* (特产科学试验), 1980(1): 7-9.
- [15] Xu S X, Wei J H, Wang L H, et al. Research on choice to ginseng breeding—different levels of maternal plant to the impact of future generations [J]. *Ginseng Res* (人参研究), 1997(2): 11-14.
- [16] Ma X J, Wang X Q, Xiao P G, et al. A study on AFLP fingerprinting of land races of *Panax ginseng* L. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(12): 707-710.