

人参种源遗传关系的 ISSR 分析

许永华¹, 张爱华¹, 金 慧², 方景煊³, 金永昌³, 张连学^{1*}

(1 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林人参研究院, 吉林 通化 134001;

3 韩国国家园艺科学院人参特作部, 阴城 忠清北道 369-871 韩国)

摘要:目的 阐明不同种源人参的遗传关系。方法 用 ISSR 分子标记研究来自人参主要分布区 17 个种源样本。结果 从 100 个 ISSR 引物中筛选出 10 个条带清晰、多态性高的引物, 共扩增出 95 条带, 其中 80 条带为多态性位点, 多态性条带比率 (PPB) 为 84.21%, 通过聚类分析, 可将 17 个人参种源聚为 4 类。结论 分子标记研究结果与人参的形态性状存在显著的相关性, 较好地揭示了人参种源间的遗传关系, 可为人参资源保育和良种选育提供科学依据。

关键词: 人参; 种源; 遗传关系; ISSR

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1164-04

Genetic relationship analysis of ginseng by ISSR analysis

XU Yong-hua¹, ZHANG Ai-hua¹, JIN Hui², BANG Kyong-Hwan³,

KIM Young-chang³, ZHANG Lian-xue¹

(1 Collage of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 Jilin Institute of Ginseng Research, Tonghua 134001, China; 3 Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural Herbal Science, Eumseong Chungcheongbuk-do 369-873, Korea)

Abstract: **Objective** To study the genetic polymorphism and genetic relationship of different resource of ginseng. **Methods** Genetic relationship in 17 accessions which came from different origins was measured by using polymerase chain reaction (PCR) with ISSR marker. **Results** Ten ISSR primers were selected from 50 ISSR primers and used for ISSR amplification. A total of 95 bands were generated, of which 80 bands were polymorphic bands (the percentage of polymorphic band, PPB= 84.21%). Seventeen germplasms of ginseng were clustered to four. **Conclusion** The similarity coefficients are calculated with NTsys 2.10e software and the dendrogram is constructed with UPGMA for providing a scientific basis on genetic breeding, differentiation, and new cultivar selection.

Key words: ginseng; germplasm; genetic relationship; ISSR

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 系五加科 (Araliaceae) 多年生植物, 又名棒捶, 是名贵中药, 有“百草之王”的美誉, 是应用最广泛、研究最深入的中药之一^[1]。《神农本草经》按药物功效分类为上品、中品、下品, 人参属中药之上品, 它的突出功效是滋补、强壮、益智和轻身延年^[2]。人参刺激身体的合成代谢、增加人体对恶劣环境或有害因子的适应性和抵抗力以及抗疲劳、解毒等作用^[3], 还具有改善勃起功能障碍的效果^[4]。栽培人参是由野生人参驯化来的混合群体, 在我国栽培历史悠久, 早在清代就进行

大规模种植^[1]。目前, 世界上栽培人参的国家主要有中国、韩国、日本、朝鲜及俄罗斯, 以我国的人参产量最多。我国人参主要产区为东北三省, 其中以吉林省为人参主产地, 占我国人参产量的 80% 以上。这些栽培人参群体, 经过千百年来生态环境和生产者的长期选择, 使不同产地的栽培人参群体出现了一些遗传分化^[5]。马小军等^[6,7]应用 RAPD 和 AFLP 等方法对我国野山参与栽培参、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; 邵爱娟等^[8]用 RAPD 法分析了我国人参农

* 收稿日期: 2009-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570187)

作者简介: 许永华 (1966—), 男, 吉林通化人, 博士研究生, 研究方向为药用植物栽培加工。

Tel: 13756943327 E-mail: xuyonghua777@yeah.net

* 通讯作者: 张连学 Tel: (0431) 84532952 E-mail: zlxbooksea@163.com

家类型大马牙和二马牙不同品系的遗传关系;李靖等^[9]用 ISSR 法分析了人参农家类型的遗传多样性和亲缘关系。而对不同国家的人参品种和农家类型的遗传变异尚缺乏深入研究。

简单序列重复区间(ISSR) 标记技术是一种新型的微卫星类分子标记技术,具有稳定性好、多态性高、实验操作简单、快速等特点,而且 ISSR 标记可以揭示整个基因组的部分特征,不受季节、环境等外在因素的影响,并呈孟德尔式遗传^[10]。因此,该技术一问世就被广泛应用于植物遗传作图与基因定位、种质资源鉴定、植物分类、进化及遗传多样性研究^[11]。

本研究用 ISSR 分子标记对来自于韩国、朝鲜和我国的 16 份人参品种及 1 份农家品种人参属西洋参 *P. quinquefolium* L. 进行亲缘关系分析,探索利用 ISSR 分子标记研究供试栽培品种的分类和系统发育的可行性,以期为全面了解人参品种的亲缘关系及构建指纹图谱提供技术支持,同时也为人参资源的开发利用及新品种的选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料:供试材料中 1~9 号和 11 号为新鲜嫩叶,分别采自黑龙江、吉林、辽宁等 3 省,12 号为山参(水参),10 号和 13~17 号为干人参根,分别购于朝鲜和韩国(表 1),除 11 号样品为五加科人参属西洋参外,其他均为人参属人参。ISSR 引物参考加拿大英属哥伦比亚大学提供的引物序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 人参种源的来源和性状

Table 1 Sources and characteristics of ginseng germplasm

编号	名称	采集地	性状
1	福星(品种)	抚松	根茎短,根主体短,人参产量高
2	宝泉(品种)	长白	根茎短,根主体短,人参产量高
3	大马牙	抚松	根茎短,根主体短,须根多,产量高
4	二马牙	集安	根茎适中,根主体长,人参主体致密
5	集美(品种)	集安	根茎适中,根主体长,人参致密
6	边条	集安	根茎适中,根主体长,人参致密,参型秀气
7	圆膀园芦	集安	根茎长,根茎圆柱型,根主体上端球型
8	石柱	宽甸	根茎长,主体小,抗性强
9	长脖	集安	根茎长,主体小,抗性强
10	高丽参	朝鲜	根茎短,主体短
11	西洋参	靖宇	根茎短,主体短
12	山参	集安	根茎长,主体短,须根长
13	天丰(品种)	韩国	紫茎,叶柄具有黑色斑点,果熟期较晚
14	仙丰(品种)	韩国	质量好,抗地上部病害
15	年丰(品种)	韩国	茎矮,双茎多,根主体短粗
16	金丰(品种)	韩国	结实率高
17	高丰(品种)	韩国	茎矮,浓绿色

1.2 DNA 的提取与纯化:采用改良 CTAB 法^[12]提取 DNA。在液氮条件下把材料迅速研磨成粉末,将粉末放入 50 mL 的离心管中,然后加入缓冲液 22.5

mL,充分混匀。将离心管置于 65 ℃ 水浴锅中,水浴 1.0~1.5 h,离心 20 min;将上清液小心转移至新离心管中,加入等体积预冷异丙醇,缓慢混匀,挑出 DNA 后,用 70% 乙醇洗涤 DNA。将离心管置于室温使其干燥,加入适量 1×TE 溶解 DNA 进行纯化后,在 -20 ℃ 下保存备用。

1.3 ISSR 扩增与检测:从加拿大 British Columbia 大学生物技术实验室提供的 100 条引物中选择了 50 条,引物由上海生工生物工程有限公司合成,经 3 个模板对 50 个引物进行初选和复选,结果从中选取了多态性较好的 10 条引物进行后续试验。

1.4 ISSR 反应体系及程序:反应体系为 25 μL,其中模板 DNA 60 ng,引物 5 μmol/L 1.0 μL,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mol/L dNTPs 0.5 μL, *Taq* 酶 1 U, ddH₂O 补足,另加石蜡油覆盖。10×PCR 缓冲液, MgCl₂, *Taq* 酶, dNTPs, 均购自天根生化科技公司。反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 47 次;72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 下保存。在 PTG-2000 型 PCR 仪上扩增。

1.5 PCR 产物凝胶电泳:扩增产物采用 6% 变性的聚丙烯酰胺凝胶检测。扩增样品中加入 4.5 μL 的 Loading buffer (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 30% 甘油水溶液), 恒功率 80 W, 电泳 2 h 左右, 银染检测。

1.6 数据统计与分析:同一引物,同一位点,根据扩增产物的有(1)无(0)得到二元资料,形成 0,1 矩阵。用 NTSYS-pc 2.10 软件进行分析,计算遗传相似系数,运用 UPGMA 法构建树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 结果检测与分析:获取高质量的基因组 DNA 是试验成功的关键步骤之一。采用 CTAB 法从材料中提取模板 DNA,所提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.80~1.90,其浓度、纯度均符合实验要求。

2.2 ISSR 引物筛选分析:随机用 3 个样品对 50 个引物进行筛选,结果有较多引物都有扩增,每个引物可扩增出 1~17 条带不等;再次对条带清晰、主带明显的初筛引物进行筛选,最终选用的 10 个引物,反应稳定、扩增性强和重复性好,见表 2。

2.3 ISSR 多态性分析:筛选出的 10 个引物共检测到 95 条带,平均每条引物扩增出 9.5 条带,ISSR 扩增片段大约集中在 100~2000 bp。其中 80 条带表现为多态性,占总的 84.21%,每个引物检测到的多

态性条带约有 8 42 条。扩增出条带最多的引物为 842, 共 17 条; 条带最少的是引物 818; 多态性最高的是引物 807 和 815, 多态率高达 100%, 见表 2。引物 873 扩增的结果见图 1。

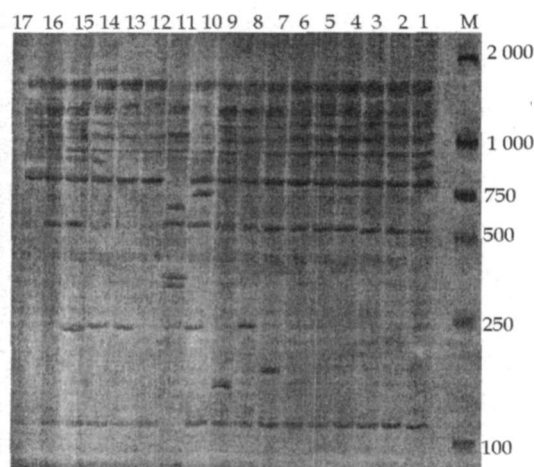
表 2 引物序列及其扩增结果

Table 2 Number of fragment amplified with ISSR primers for 17 ginseng accessions

引物	序 列	总条 带数	多态性带数 (人参种内多态)	多态 率/%
807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	8	8	100
815	AGAGAGAGAGAGAGAGG	8	8(6)	100
818	CACACA CACACA CACAG	5	4	80
823	A CACACACACACACA CT	8	6(3)	75
826	A CACACACACACACA CG	8	6(5)	75
842	GAGAGAGAGAGAG AGAYG	17	16(14)	94
856	CACACA CACACA CACARC	13	8	63
859	CACACA CACACA CACARG	6	5	83
861	ACCACCACCACCACC	6	5	83
873	AGCAGCAGCAGCAGC	16	14	88

2.4 遗传距离聚类分析: 利用聚类分析软件 NT-SYS-pc 2.10 对 ISSR 扩增所得的多态性位点进行分析, 得到人参 17 份样品的遗传相似矩阵, 相似值为 0.792 时, 可划分成 4 大类, 见图 2, 第 I 类有 1~9 号种源, 第 II 类有 10 号和 13~17 号种源, 第 III 类 12 号为山参, 第 IV 类为 11 号西洋参, 第 I 类中再分

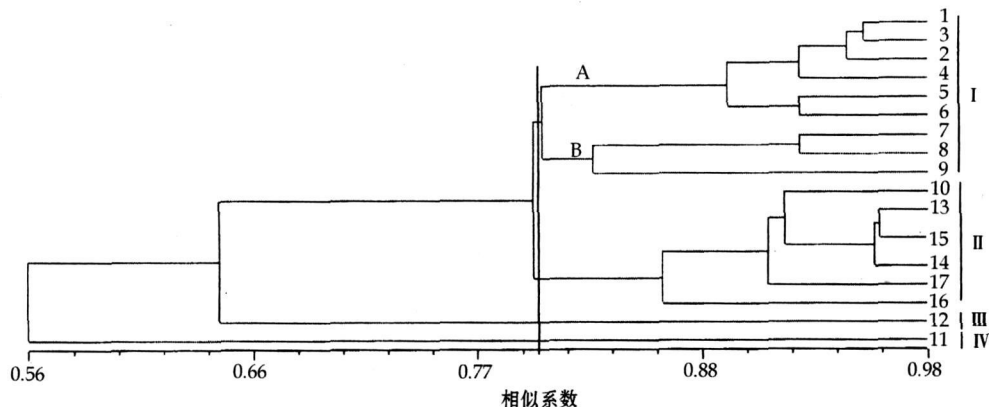
为 A 和 B 类。A 为马牙类, B 为长脖类。



M-D2000 1-福星 2-宝泉 3-大马牙 4-二马牙 5-集美
6-边条 7-圆膀园芦 8-石柱 9-长脖 10-高丽参 11-西洋参
12-山参 13-天丰 14-仙丰 15-连丰 16-金丰 17-高丰
M-D2000 1-Fuxing 2-Baoquan 3-Damaya 4-Ermaya
5-Jimei 6-Biantiao 7-Yuanbangyuanlu 8-Shizhu
9-Changbo 10-Korea ginseng 11-American ginseng
12-Wild ginseng 13-Chunpoong 14-Sunpoong
15-Yunpoong 16-Gumpoong 17-Gopoong

图 1 引物 873 扩增结果

Fig 1 ISSR Amplification results of ginseng with Primer 873



1-福星 2-宝泉 3-大马牙 4-二马牙 5-集美 6-边条 7-圆膀园芦 8-石柱 9-长脖 10-高丽参
11-西洋参 12-山参 13-天丰 14-仙丰 15-连丰 16-金丰 17-高丰
1-Fuxing 2-Baoquan 3-Damaya 4-Ermaya 5-Jimei 6-Biantiao 7-Yuanbangyuanlu 8-Shizhu 9-Changbo 10-Korea
ginseng 11-American ginseng 12-wild ginseng 13-Chunpoong 14-Sunpoong 15-Yunpoong 16-Gumpoong 17-Gopoong

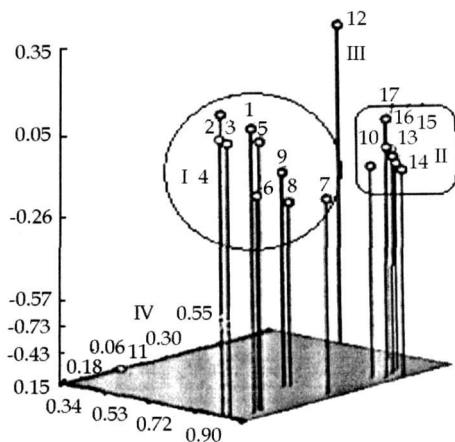
图 2 17 份人参材料 ISSR 聚类结果

Fig 2 Dendrogram of 17 ginseng accessions based on ISSR marker

2.5 主成分分析: 在 NTSYS-pc 2.10 软件上对 17 份人参材料进行主成分分析, 第一、第二和第三的主成分方差累积贡献率为 58.13%, 并根据主成分进行作图, 所形成的人参材料的位置分布如图 3 所示。在主成分 3-D 散点图上, 位置靠近者表示其关系密切, 远离者表示其关系疏远。将位置靠近的材料划

归在一起, 结果表明主成分分析的结果与 UPGMA 聚类分析结果基本一致, 同一地区的大部分人参材料聚在一起, 主成分分析结果更直观地表明了不同人参材料之间的亲缘关系, 是对聚类结果的直观解释和佐证。

3 讨论



1-福星 2-宝泉 3-大马牙 4-二马牙 5-集美 6-边条
7-圆膀园芦 8-石柱 9-长脖 10-高丽参 11-西洋参
12-山参 13-天丰 14-仙丰 15-连丰 16-金丰 17-高丰
1-Fuxing 2-Baoquan 3-Damaya 4-Ermaya 5-Jimei
6-Biantiao 7-Yuanbangyuanlu 8-Shizhu 9-Changbo
10-Korea ginseng 11-American ginseng
12-wild ginseng 13-Chunpoong 14-Sunpoong
15-Yunpoong 16-Gumpoong 17-Gopoong

图3 17份人参材料 ISSR主成分分析

Fig 3 PCA of 17 ginseng accessions based on ISSR marker

人参大部分分布于北温带, 主要在中国、韩国、朝鲜、日本和俄罗斯。在我国则以东北为分布中心。人参品种和农家类型是由野山参驯化后经人工选育而得到, 一般是根据其根的形态特征来划分的。目前人参品种及农家类型已经形成了各自相对稳定的性状特征。本研究结果表明, 人参品种及农家类型存在明显的遗传差异, 通过聚类分析和主成分分析, 西洋参与人参的相似系数最小(0.560), 山参与栽培人参的相似系数为0.648, 明显区分山参与栽培的人参, 与马小军的研究结果一致^[1]。山参与栽培的人参的相似系数甚小, 说明通过长期的人工栽培和驯化, 人工选择和自然选择使品种和农家类型的遗传基因在野生种的基础上发生了较大的变化, 突显了植物体的优良特性, 使外观特征及内在质量等遗传性状稳定, 形成了优质的人参品种和农家类型。供试17个种源在相似系数为0.792时可分为4大类, 原产于美洲的西洋参与产于亚洲的人参明显各聚为一类, 在人参中产于中国的山参12号与栽培的人参间遗传距离显著, 产于韩国栽培人参和朝鲜栽

培人参聚为一类, 其余的中国人参聚为一类, 栽培的人参遗传变异与地理分布存在显著的相关性, 地理位置接近的种源遗传性状较为接近。不同国家间很少或基本上不进行种质资源交换, 影响本国内人参遗传多样性, 影响人参新品种选育, 所以需要进行国际间人参种源交流以培育新的优良品种。从聚类分析图中得出, I类为中国人参, 其中A亚类中包括1~6号种源, 是马牙类人参, B亚类包括7~9号种源, 为长脖类(圆膀园芦, 石柱参, 长脖参), 结果同马小军等^[1] RAPD结果一致, 研究表明形态分类与ISSR分子标记分类一致, 从芦头分类具有一定的科学性。

结果表明, 人参的亲缘关系虽然比较近, 可是依然能够通过分子标记技术进一步区分中国、朝鲜、韩国的亲缘关系。说明ISSR分子标记技术在鉴定物种亲缘关系上有重要的应用价值。

综上所述, 该研究利用ISSR标记技术初步揭示了人参主要品种与农家品种的亲缘关系, 为进一步对人参种源进行遗传多样性分析和人参育种奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 国产人参种质资源研究进展[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(5): 289
- [2] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164附2
- [3] 张均田. 人参研究的回顾与展望[J]. 药学报, 1995, 30(4): 321-325
- [4] 陈琳琳, 贾韦国, 苏华, 等. 人参用于治疗勃起功能障碍的最新机制及临床研究[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(2): 7
- [5] 马小军, 汪小全, 孙三省, 等. 野生人参的RAPD指纹研究[J]. 药学报, 1999, 34(4): 312
- [6] 马小军, 汪小全, 徐昭玺, 等. 人参不同栽培群体遗传关系的RAPD分析[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 587
- [7] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 人参农家类型AFLP指纹研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 3-6
- [8] 邵爱娟, 李欣, 黄璐琦, 等. 用RAPD技术对人参栽培群体的遗传分析[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 1033-1036
- [9] 李靖, 程舟, 杨晓伶, 等. 人参农家类型遗传多样性的ISSR分析[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1392-1395
- [10] 郭丁丁, 马逾英, 唐琳, 等. 白芷种质资源多样性的ISSR研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1627-1630
- [11] 李海生. ISSR分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21
- [12] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001