

砂仁遗传多样性的 ISSR 分析

张忠廉¹, 李学兰¹, 杨春勇², 唐德英¹, 王继永³, 高微微^{2*}

1. 中国医学科学院 药用植物研究所云南分所, 云南 景洪 666100

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 中国药材公司云南分公司, 云南 昆明 653100

摘要:目的 对不同产地、不同表型性状的砂仁 *Amomi Fructus* 种质资源进行遗传多样性分析。方法 采用简单序列重复区间 (ISSR) 扩增技术, 对来自云南、海南、广东、福建等地区的 21 个砂仁样品进行遗传多样性及亲缘关系分析; 同时, 对其中 16 个阳春砂仁的株高、茎粗、叶片数、叶片大小等部分植物学表型性状进行测定, 利用这些数据对各居群砂仁进行聚类分析。结果 ISSR 分析结果显示, 从 60 条 ISSR 引物中筛选出 11 条用于扩增, 共检测出 54 条 DNA 条带, 多态性位点为 22 个, 多态性条带比率 (PPB) 可达 40.74%, Nei's 基因多样性 (H) 为 0.116 1, Shannon's 多态性信息指数 (I) 为 0.184 2; 各居群表型性状差异较小。结论 砂仁种质资源的遗传多样性较低。

关键词: 砂仁; ISSR; 遗传多样性; 表型性状; 聚类分析

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0570-05

ISSR analysis on genetic diversity in *Amomi Fructus*

ZHANG Zhong-lian¹, LI Xue-lan¹, YANG Chun-yong², TANG De-ying¹, WANG Ji-yong³, GAO Wei-wei²

1. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Yunnan Branch of Chinese Medicinal Material Company, Kunming 653100, China

Abstract: Objective To evaluate the genetic diversity of germplasm resources for *Amomi Fructus* from various habitats in different phenotypes. **Methods** Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers were used to analyze the genetic diversity and the genetic relationship among 21 samples of *Amomi Fructus* collected from Yunnan, Hainan, Guangdong, and Fujian Provinces; At the same time, the phenotypic characters of 16 *Amomum villosum* samples were measured in height, stem diameter, blade number, and blade size, etc. Then cluster analysis on all populations of *Amomi Fructus* was carried out based on the above data. **Results** Eleven primers selected from 60 ISSR-primers were used for amplification and a total of 54 DNA bands were obtained, including 22 polymorphic bands. At species level, the average percentage of polymorphic bands (PPB) was 40.74%, Nei's gene diversity (H) was 0.116 1, Shannon's information index (I) was 0.184 2. There was a little difference of morphological characteristics. **Conclusion** The genetic diversity of germplasm resources in *Amomi Fructus* is lower.

Key words: *Amomi Fructus*; inter-simple sequence repeats (ISSR); genetic diversity; phenotypic characteristic; cluster analysis

砂仁为我国著名“四大南药”之一, 正品为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、绿壳砂 *A. villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen 或海南砂 *A. longiligulare* T. L. Wu 的干燥成熟果实^[1], 主产于广东、云南、广西和福建。阳春砂原产地为广东阳春县, 1963 年引种至云南并大面积种植, 至

1998 年为止, 云南砂仁产量已占全国产量的 65.5%, 成为我国重要的砂仁商品基地; 绿壳砂主产于越南、缅甸、泰国; 海南砂因主产于海南而得名。砂仁性辛、温, 归脾、胃、肾经, 具有化湿行气、温中止泻、安胎之功效, 药食两用, 具有很好的药用和商用价值。

收稿日期: 2010-07-19

基金项目: 云南省重大创新工程 (2008IF018)

作者简介: 张忠廉 (1982—), 男, 山西省阳泉市人, 实习研究员, 硕士研究生, 从事药用植物种质资源方面的研究, 主要研究方向为热带药用植物分子生物学。Tel: 15924692393 E-mail: zzl0605@163.com

*通讯作者 高微微 Tel: 13911251765 E-mail: wwgao2009@yahoo.cn

简单重复序列区间扩增技术 (inter simple sequence repeat, ISSR), 由加拿大 Zietkiewicz 等^[2]于 1994 年提出, 其特点是专一性强, 多样性好, 操作简便, 重复性好, 无需预先知道任何序列信息。该技术在阐释物种种内不同群体和个体遗传差异特性的遗传多样性研究方面应用广泛^[3]。随着科学技术的发展, DNA 分子标记技术目前已广泛应用于动植物和微生物的遗传多样性研究中^[4-5]。对于砂仁, 除有利用 RAPD 技术对阳春砂仁进行道地性研究的报道外^[6], 未见其他报道。

迄今为止, 云南产区砂仁种植已有 40 多年的历史, 随着栽培年限的增加, 不同居群间或居群内

砂仁的形态出现明显差异。本实验采用 ISSR 标记技术对不同居群的砂仁进行遗传多样性分析, 同时结合居群内及居群间植株形态的对比, 探讨砂仁表型差异与遗传背景及环境因素的关系, 为砂仁遗传图谱构建、种质资源的保存及遗传育种等研究提供一定的理论依据。

1 材料和试剂

1.1 材料

所用样品共 21 份, 样品信息见表 1, 样本经中国医学科学院药用植物研究所云南分所李学兰研究员鉴定, 因 21 份样品表型性状介于阳春砂仁与绿壳砂仁之间, 故种名待定。

表 1 砂仁种质资源来源
Table 1 Germplasm resources of *Amomi Fructus*

样本编号	种名	采集地点	经纬度	海拔/m	样本数
1、2	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)	云南省勐腊县象明乡	101°17'868" 22°08'022"	719	2
3、4		云南省勐腊县象明乡	101°19'630" 22°08'443"	845	2
5、6		云南省勐腊县尚勇乡	101°46'345" 21°15'020"	855	2
7、8		广东省阳春县蟠龙乡	111°54'343" 22°11'915"	20	2
9		云南省澜沧县拉巴乡	99°40'008" 22°29'640"	1 093	1
10		云南省西盟县勐梭乡	101°24'716" 21°38'510"	870	1
11	海南砂 (<i>A. longiligulare</i>)	海南省陵水县吊罗山乡	109°53'013" 18°41'926"	626	1
12	绿壳砂 (<i>A. villosum</i> var. <i>xanthioides</i>)	云南省景洪市基诺乡	101°00'951" 22°04'386"	1 016	1
13		福建省长泰县美岭乡	117°50'249" 24°42'617"	209	1
14、15		广东省阳春县春城乡	111°44'512" 22°12'722"	32	2
16		海南省屯昌县乌坡乡	110°07'154" 19°09'811"	120	1
17		广西南宁市药植园	108°22'254" 22°51'600"	13	1
18		云南省景洪市关坪乡	100°53'076" 22°15'749"	894	1
19、20		云南省景洪市景哈乡	101°37'927" 22°18'787"	856	2
21	<i>Amomum</i> sp.	云南省景洪市关坪乡	100°53'040" 22°15'697"	895	1

1.2 试剂

ISSR 引物, 上海生工生物技术有限公司; rTaq DNA 聚合酶, 大连宝生物工程有限公司, 包括: TaKaRa TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL), 10×buffer (Mg²⁺ free), dNTP mixture (各 2.5 mmol/L), MgCl₂ (25 mmol/L); Marker, 北京鼎国生物技术有限公司 (B031), CTAB 缓冲液: 100 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl、2%CTAB、40 mmol/L 巯基乙醇; 沉淀缓冲液: 1%CTAB、50 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0)、10 mmol/L 的 EDTA、20 mmol/L 巯基乙醇; 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

每个样本均取其植株的新鲜嫩叶, 迅速将其置于装有变色硅胶的塑料封口袋中, 干燥后保存, 并置于超低温冰箱中备用。

采用改良的 2×CTAB 法^[7]提取 DNA, 提取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳判断提取质量。

2.2 ISSR-PCR 反应体系的建立

ISSR 引物序列按照加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室的 ISSR 引物序列设计, 由上海生工生物技术有限公司合成, 共 60 个引物。以所提取的样品 1、10 基因组 DNA 进行引物筛选, 共筛选出 12 个可用于砂仁遗传多样性分析的 ISSR 引物, 其引物序列、退火温度及扩增条带情况见表 2。

PCR 反应体系为: 20 μL 反应体系中, Mg²⁺ 1.5

表 2 所筛选出的引物及引物扩增条带

Table 2 Screened primer and their amplification bands

编号	引物序列	退火温度/℃	扩增条带数	多样性条带
UBC807	(AG) ₈ T	50	3	2
UBC808	(AG) ₈ C	50	7	6
UBC809	(AG) ₈ G	52	4	1
UBC811	(GA) ₈ G	52	1	0
UBC812	(GA) ₈ A	50	9	2
UBC813	(CT) ₈ T	50	3	3
UBC816	(GA) ₈ T	50	3	2
UBC835	(AG) ₈ YC	52	6	0
UBC840	(GA) ₈ YT	52	8	3
UBC841	(AG) ₈ YC	55	7	1
UBC842	(GA) ₈ YG	55	3	2

Y=C/T

mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.4 μmol/L、TaqDNA 聚合酶 1.5 U、buffer 2.5 μL 和模板 DNA 50 ng，加 ddH₂O 至 20 μL。

PCR 扩增程序：PCR 反应在 Biometra.tgradient 96 型扩增仪上进行，反应参数为：94℃ 预变性 5 min；接着进行 35 个循环：94℃ 变性 30 s，50~55℃（因引物序列不同退火温度不同）退火 1 min，72℃ 延伸 90 s；循环结束后 72℃ 延伸 10 min。反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，电压 100 V，电泳 90 min，经 EB 染色后用 Bio-Rad 公司的 Gel Doc 1000 型凝胶成像仪观察并照相。

2.3 样本表型特征观察

采用田间对比试验，将 16 份不同来源的阳春砂仁幼苗移栽于景洪市中国医学科学院药用植物研究所试验苗圃中，一年后，各样本随机抽取成年植株 15 株，统计其株高、茎粗、匍匐茎粗、叶片数、叶片长、叶片宽、叶舌长的数据，计算各特征值平均值及标准差。

2.4 数据处理和结果分析

2.4.1 ISSR 实验数据处理 Marker 相对分子质量 100~3 000 bp，选取稳定、清晰的条带进行统计分析，依据电泳图谱中同一位置上电泳条带的有无建

立二元矩阵表，有带的记为“1”，无带的记为“0”。每条引物均重复扩增 2 次，对于较弱条带，如在重复性实验中反复出现，赋值 1。利用 PopGen1.32 对其进行分析，统计多态性条带百分率 (PPB)、Nei's 基因多样性 (H)、Shannon's 多态性信息指数 (I)；根据 Nei's 遗传距离，采用 NTSys-pc2.1 分析软件的 UPGMA 法进行系统聚类分析，构建系统聚类图。

2.4.2 表型性状数据处理 所得数据用 SPSS13.0 软件进行分析，比较样品间表型性状差异。

3 结果

3.1 ISSR 遗传多样性分析

3.1.1 ISSR 扩增结果 通常情况下，对于显性标记的 ISSR，每一条扩增条带都对应着一个 DNA 分子位点，出现的多态扩增带，说明样品在该位点存在差异。对 21 个不同居群的砂仁样品进行遗传多样性分析，共检测到 54 个位点：多态性位点为 22 个，PPB 为 40.74%， H 为 0.116 1， I 为 0.184 2，多态性较低。引物 UBC835 扩增结果，在图 1 中可以看出，砂仁不同供试材料的主谱带基本一致，说明它们的遗传背景有很大相似性。

21 20 19 18 17 16 15 14 M 13 12 0 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

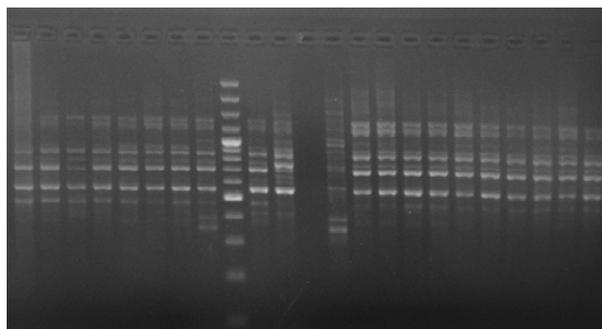


图 1 引物 UBC835 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of ISSR-PCR with Primer UBC835

3.1.2 ISSR 聚类分析 依据不同供试材料间的遗传距离所建立的聚类分析图见图 2。总体上看，各个砂仁样品间的遗传距离与不同砂仁种有直接关系，所有阳春砂仁聚为一支，然后与海南砂仁（样品 11）聚为一支，最后与绿壳砂仁（样品 12）及样品 21 聚在一起。砂仁不同供试材料间的遗传距离较小，相似系数达 0.8 以上，其遗传背景有很大的相似性。所有样本中，遗传距离最大的是样品 11 与样品 21，其 Nei's 遗传距离是 0.300 1，二者亲缘关系最远。

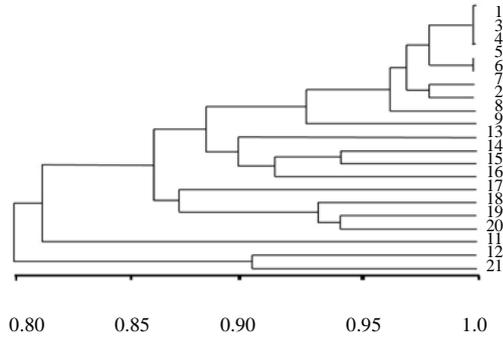


图 2 以 Nei's 遗传距离构建的砂仁 ISSR 聚类图
Fig. 2 ISSR dendrogram of *Amomi Fructus* based on Nei's genetic distance

在阳春砂仁样本中，样品采集地点地理位置距离越远，样本的亲缘关系越远，距离越近，亲缘关系越近，这与文献报道的结果相类似^[7]。样品 1~6 全部采于云南省勐腊县，聚类分析结果显示，6 份样品的遗传关系很近，遗传一致度均在 0.95 以上；样品 7、8 均来自于广东省阳春县，聚类分析结果也显示了二者之间高度的遗传相似性。但也有个别情况，如采集于云南省澜沧县的砂仁样品 9，其遗传背景却与采于广东省阳春县的样品 7、8 相近。

另外，未经鉴定的样品 21 表型特征介于阳春砂仁与绿壳砂仁之间，种名难以确定，但从聚类图上可以看出，样品 21 与样品 12 聚为一支，说明其与绿壳砂仁有很好的亲缘关系，种名有待进一步研究。

3.2 砂仁表型性状分析

大多数阳春砂仁的植株性状在居群内和居群间无显著差异（表 3）。绝大多数产于云南勐腊县、澜沧县、西盟县的阳春砂仁与广东省阳春县、海南省屯昌县的阳春砂仁在所测定的 7 个性状中均无显著差异。云南勐腊县尚勇乡的 2 份样本 A5 和 A6，在叶长和叶舌上出现显著差异，同样景洪市景哈乡的 2 份样本 A19 和 A20，在株高、茎粗、叶片数方面表现出较大差异。同一居群内植株性状表现有差异，说明居群内可能有个体变异的现象。

4 讨论

从 ISSR 聚类图可以看出，砂仁 3 个种间遗传距离较近，相比之下，阳春砂仁与海南砂仁间遗传距离较小，海南砂仁与绿壳砂仁间遗传距离较远。砂仁不同品种间及不同居群间都有很好的遗传关系。Hamrick^[8]认为，物种分布的地理范围与遗传多样性紧密相关，即物种分布越广泛，其遗传多样性越丰富，反之亦然。但在本实验中，收集不同产地

表 3 阳春砂仁样本表型性状数据

Table 3 Phenotypic character data in different *Amomi Fructus* groups

编号	株高/cm	茎粗/mm	匍匐茎粗/mm	叶片数	叶长/cm	叶宽/cm	叶舌长/mm
A1	116.07±13.16 b	8.46±0.90 b	6.70±0.88 b	22.27±2.25 b	30.20±1.90 b	5.11±0.51 b	5.85±0.53 ab
A2	141.27±30.67 b	8.42±0.88 b	6.49±1.25 b	26.80±2.40 b	31.47±2.03 b	5.14±0.63 b	6.00±0.85 ab
A3	107.60±7.55 b	8.68±1.10 b	6.41±1.27 b	21.60±3.57 b	31.60±3.69 ab	4.92±1.27 b	5.72±0.91 ab
A4	148.27±11.25 b	9.37±1.52 b	7.51±1.13 b	25.33±2.26 b	32.47±2.45 ab	5.84±0.55 b	6.21±0.69 ab
A5	138.60±13.25 b	9.26±0.96 b	7.86±1.58 ab	23.73±2.96 b	31.67±1.91 b	5.17±1.25 b	6.02±0.70 ab
A6	153.13±17.94 b	9.36±1.26 b	7.51±1.29 b	27.07±2.34 b	34.00±2.24 a	5.23±0.64 b	6.54±0.84 a
A7	117.80±10.60 b	8.07±0.80 b	6.59±1.13 b	24.33±1.59 b	28.93±2.88 b	5.15±0.88 b	5.09±0.61 b
A8	118.20±14.30 b	8.62±1.04 b	6.05±0.85 b	24.70±3.23 b	29.80±3.58 b	5.40±0.93 b	5.53±1.10 b
A9	108.90±17.23 b	8.79±0.62 b	6.76±0.95 b	21.30±2.26 b	32.20±3.01 ab	5.44±1.00 b	5.46±0.62 b
A10	120.27±14.33 b	9.40±1.21 b	7.36±0.80 b	23.55±3.30 b	32.18±3.25 ab	4.96±0.81 b	5.49±0.85 b
A14	139.60±24.92 b	8.08±0.98 b	6.34±0.98b	29.70±3.43 ab	32.70±4.76 ab	5.86±1.17 ab	5.53±1.04 b
A15	141.00±24.73b	8.72±1.03 b	6.60±1.15 b	26.40±4.50 b	32.33±4.86 ab	5.75±1.10 b	6.40±0.90 a
A16	130.33±11.29 b	8.36±0.86 b	6.31±1.32 b	24.73±2.87 b	29.60±2.67 b	5.07±0.48 b	4.72±0.78 b
A18	148.53±17.35 b	8.10±1.28 b	6.26±1.55 b	27.27±3.51 b	30.27±2.43 b	5.21±1.04 b	4.88±1.31 b
A19	156.69±23.63 b	9.73±1.33 ab	7.71±1.44 b	29.93±6.70 a	27.98±3.07 b	5.74±0.87 b	5.00±0.76 b
A20	189.8±19.01 a	10.52±1.27 a	8.72±2.42 a	29.07±4.85 ab	31.10±2.78 b	6.56±1.61 a	5.64±1.31 b

同组数据肩标字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)，字母相同者表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Different letters in same column show significant difference ($P < 0.05$), same letters show no significant difference ($P > 0.05$)

的砂仁样品, 利用表型性状及 ISSR-PCR 法对其进行遗传多样性分析, 发现不同居群间的砂仁样品遗传一致度较高。一个物种, 其种内遗传多样性或遗传变异越丰富, 物种对环境变化的适应能力越强, 其进化潜力越大。因此, 对于砂仁这一种质资源来说, 采取相应的资源保护措施势在必行。个别出现形态与遗传不一致的情况 (如样品 21, 其表型特征介于阳春砂仁与绿壳砂仁之间, 而遗传关系却与绿壳砂仁相近), 其原因可能有两种: 一是生长环境造成与当地品种在形态上的相似性; 二是品种间出现杂交的情况。另一方面, 表型性状变异程度或变异幅度越大, 对种质变异和创新贡献率越高^[9]。实验发现在样品 19、20 个体株高、茎粗、匍匐茎粗、叶片数均为所有样品中的最大值, 可作为进一步选育优良品种的原始材料, 或作为改良某些品种的理想亲本资料, 以提高品种抗逆性或砂仁产出率。

目前看来, 单纯的引种栽培并不能解决砂仁资源匮乏的现状。对砂仁种质资源进行有效保护的首要任务是进行大规模的种质采集, 保护现存自然种群, 保存尽可能多的砂仁样品, 以达到保护基因资源的目的。其次, 通过人工授粉、种质杂交、人工

移植等方法, 加强种群之间的基因交流, 以提高砂仁的遗传多样性和对环境的适应能力。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [3] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [4] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [5] 张阵阵, 郭美丽, 张汉明. 红花 RAPD 和 AFLP 分子标记技术多态性效率比较 [J]. *中草药*, 2007, 38(3): 449-451.
- [6] 廖丽, 郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. *中草药*, 2009, 40(7): 1131-1135.
- [7] 徐吉银, 丁平. 道地药材阳春砂不同居群的 RAPD 分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2005, 16(3): 194-196.
- [8] Hamrick J L, Godt M J W. *Allozyme Diversity in Plants* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989.
- [9] 周云龙. 植物生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.