

• 药材与资源 •

不同产地仙茅遗传多样性的 ISSR 分析

李隆云, 陈大霞*, 钟国跃, 李泉森

重庆市中药研究院 中药种植研究所, 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

摘要:目的 从 DNA 水平上对仙茅种质资源进行遗传多样性分析。方法 对我国 25 个主要分布区的仙茅进行 ISSR-PCR 扩增与检测。扩增结果转化为“0”、“1”矩阵后, 利用 Treeconw 软件计算遗传距离, 并采用 UPGMA 聚类法构建亲缘关系树状图。结果 14 条引物共得到 176 条清晰可辨的扩增条带, 其中有 151 条呈现多态性, 占 85.8%。遗传距离变化范围在 0.177 2~0.403 0。25 份样品分为两大类, 聚类较为复杂, 大多种质不具明显地理相关性, 仅在小分支中呈现出一定的地域性分布规律。结论 我国仙茅植物的遗传多样性十分丰富, 为筛选优质种质资源提供了丰富的遗传基础。

关键词: 仙茅; ISSR; 种质资源; 遗传多样性; 多态性

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)05-0967-05

Analysis on genetic diversity of *Curculigo orchioides* from different habitats by ISSR

LI Long-yun, CHEN Da-xia, ZHONG Guo-yue, LI Quan-sen

Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of *Curculigo orchioides* from different habitats at DNA molecular level. **Methods** *C. orchioides* from 25 germplasmic resources was analyzed by ISSR-PCR. After translating the amplification results into “0” and “1” matrix, the genetic distances were calculated by Treeconw software and the systematic diagram of genetic relationship was clustered by UPGMA method. **Results** A total of 176 bands were detected using 14 primers, among which 151 were polymorphic bands. The average percentage of polymorphic bands was 85.8%. Genetic distances were changed from 0.177 2 to 0.403 0. Clustering results showed that the genetic relationship of *C. orchioides* was more complex. The correlation between the most germplasm and its geographic origin was not very obvious, except a few of *C. orchioides* from the same region being in the same group, and followed the law of geographical distribution in the tested materials. **Conclusion** Significant polymorphism and genetic diversity are observed among *C. orchioides* germplasm resources which could provide a wealth of genetic basis for the germplasm high quality.

Key words: *Curculigo orchioides* Gaertn.; ISSR; germplasm resources; genetic diversity; polymorphism

仙茅为仙茅科仙茅属植物仙茅 *Curculigo orchioides* Gaertn. 的干燥根茎。其味辛、甘, 温, 有小毒, 具有温肾壮阳、祛寒除湿、益精血、强筋骨、行血消肿的功效, 主治阳痿、腰膝冷痹、脾虚腹冷等症。仙茅分布于我国西南、华南、华东及中南等地区, 也分布于东南亚各国及日本, 主产于四川、重庆、云南、贵州、广西、广东、湖南、湖北等省。仙茅一般野生于海拔 2 000 m 以下的山坡林下、灌丛中或草地荒坡上。仙茅是传统中药, 长期依靠采挖野生药材供临床应用。近年来, 随着以仙

茅为原料的中成药的开发利用, 需求量不断增加, 从而导致野生仙茅被过度采挖, 资源濒临枯竭。因此, 急需根据野生仙茅的资源特点进行保护生物学研究, 为仙茅的合理开发利用与资源保护提供依据。

简单重复序列区间扩增多态性标记技术 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 是由 Zietkiewicz 等^[1] 于 1994 年创建的一种基于 PCR 的分子标记技术。该技术是一种类似 RAPD, 但利用加锚 SSR (simple sequence repeat) 寡核苷酸作引物对基因组进行 PCR 扩增的标记系统, 具有信息量大、稳定性好、多态

收稿日期: 2012-01-13

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2001BA701A32); 国家科技攻关计划项目 (2004BA604A04); 重庆市科技计划项目 (6455)

作者简介: 李隆云 (1964—), 男, 四川巴县人, 重庆市中药研究院副院长, 研究员, 博士, 国家中医药管理局重点学科中药生药学学科带头人, 长期从事药用植物栽培及分子生物学研究。Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

*通讯作者 陈大霞 Tel: (023)89029061 E-mail: 17837@163.com

性高、成本低、操作快速简便的优点；呈孟德尔式遗传，具显性或共显性特点，因此该技术被广泛用于药用植物品种鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性检测等方面的研究^[2-3]。

长期以来，我国仙茅的研究大多集中在化学^[4]、组织培养^[5]、传统鉴别^[6]等方面，分子水平上的研究仅见于采用 SRAP^[7-8]和 RAPD^[9-10]标记分析仙茅属植物的遗传关系，而有关不同产地来源的仙茅种质资源遗传多样性和遗传变异的研究至今尚未见报道。本研究以来源于我国不同主分布区的 25 份仙茅种质为材料，采用 ISSR 标记技术研究其遗传多样性，旨在探讨我国仙茅地理种源的遗传变异特点，

为仙茅种质资源的进一步收集利用及新种质的筛选提供分子水平上的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

25 份仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn. 种质资源，分别采自云南、贵州、四川、广西、重庆、海南等地（表 1），由重庆市中药研究院秦松云副研究员、李泉森副研究员及成都中医药大学卫莹芳教授进行物种鉴定。根据均匀分布、随机取样的原则，每个产地均选取 10 株成熟植株，在植株上选择当年萌发的幼嫩叶片，低温下洗净、晾干，-80℃超低温冰箱中保存备用。

表 1 材料来源

Table 1 Sources of materials

编号	来源	编号	来源	编号	来源
1	海南保亭	10	云南文山	19	四川眉山仁寿
2	广西扶绥	11	云南罗平	20	云南文山县小街镇
3	重庆荣昌	12	云南蒙自	21	云南峨山
4	云南思茅	13	贵州兴义	22	重庆南岸区
5	四川米易普威	14	广西隆林	23	四川宜宾
6	四川米易二糖厂	15	广西南丹	24	云南绥江
7	四川西昌师专	16	贵州独山	25	四川宜宾屏山县
8	四川宜宾屏屏区明威乡	17	贵州麻江		
9	云南水富	18	四川彭山		

1.2 仙茅基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取每个产地的 10 个个体的基因组 DNA，用 Smart SpecTM3000 型分光光度计（BIO-RAD 公司）测定其质量浓度和纯度。将 10 个个体的基因组 DNA 等量混合组成“基因池”，质量浓度为 40 ng/μL，用于 ISSR 分析。

1.3 引物筛选

扩增引物采用加拿大哥伦比亚大学（UBC）公布的 ISSR 引物序列，由北京赛百盛基因技术有限公司合成。随机选取 2 个产地的 DNA “基因池”进行 18 条引物的筛选，从中选出 14 条能扩增出多态性条带、背景清晰、反应稳定的引物用于全部样本的 ISSR 分析。每条引物的变性温度根据引物的 T_m 值设置 12 个梯度进行筛选。具体引物、序列及退火温度见表 2。

1.4 ISSR-PCR 扩增与产物检测

ISSR-PCR 扩增在 TaKaRa PCR Thermal cycler Dice Model No.TP600 扩增仪（宝生物工程有限公司）上进行。ISSR 反应体系：25 μL 反应体系中含

有 1×PCR 缓冲液、Mg²⁺1.5 mmol/L、dNTP 200 μmol/L、引物 0.4 μmol/L、模板 40 ng 和 TaqDNA 聚合酶 1 U。ISSR 扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，49.5~63.0℃（每条引物不同，见表 2）退火 1 min，72℃延伸 1.5 min，共 35 个循环；循环结束后 72℃延伸 7 min，4℃保存。

在 1×TAE 缓冲系统下，扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离，电压不超过 5 V/cm。当溴酚蓝指示剂距离琼脂糖凝胶前沿约 2~3 cm 时停止电泳，用 0.5 μg/mL EB 染色 15~30 min 后，在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统（BIO-RAD 公司）上照相并记录扩增情况。

1.5 数据的统计与分析

根据扩增产物条带的迁移率及有无统计所有的二元数据，有带赋值为“1”，无带赋值为“0”，从而形成 ISSR 标记的“0”、“1”二维数字原始矩阵。用 TREECONW 分析软件计算材料间遗传距离，在此基础上按 UPGMA 方法进行聚类分析，绘制亲缘关系树状图。

表 2 ISSR 扩增引物及多态性
Table 2 ISSR amplification primers and polymorphism

引物	序列	$T_m / ^\circ\text{C}$	退火温度 / $^\circ\text{C}$	总带数	多态性带数	多态性百分比 / %
UBC807	(AG) ₈ T	52.0	55.0	11	11	100.0
UBC808	(AG) ₈ C	52.0	57.5	16	16	100.0
UBC809	(AG) ₈ G	52.0	60.0	5	5	100.0
UBC811	(GA) ₈ C	52.0	57.0	17	14	82.4
UBC815	(CT) ₈ G	52.0	49.5	15	13	86.7
UBC818	(CA) ₈ G	52.0	57.5	8	7	87.5
UBC824	(TC) ₈ G	52.0	57.0	12	10	83.3
UBC827	(AC) ₈ G	52.0	63.0	19	17	89.5
UBC835	(AG) ₈ YC	—	57.0	9	6	66.7
UBC842	(GA) ₈ YG	—	60.6	15	14	93.3
UBC845	(CT) ₈ RG	—	53.8	9	6	66.7
UBC848	(CA) ₈ RG	—	60.6	16	14	87.5
UBC857	(AC) ₈ YG	—	59.3	10	7	70.0
UBC880	(GGAGA) ₃	48.0	57.5	14	11	78.6
平均	—	—	—	12.6	10.8	85.8
总合	—	—	—	176	151	—

2 结果与分析

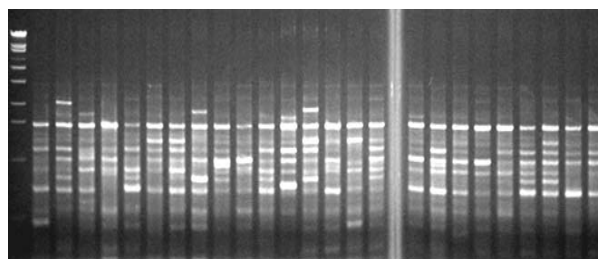
2.1 扩增产物的 ISSR 多态性分析

本实验 ISSR 引物的筛选结果显示, 18 条引物中有 15 条能扩增出产物, 其中 UBC890 无多态性, 其余 14 条均能扩增出多态性条带 (表 2)。图 1 所示为 ISSR 引物 UBC842 的扩增图谱。14 条引物共扩增出 176 条 DNA 片段, 其中有 151 条具多态性, 平均多态性百分率为 85.8%。每条引物的多态百分率在 66.7%~100.0%, 其中多态百分率最高的引物是 UBC807、UBC808、UBC809, 均达到 100.0%, 多态百分率最低的引物是 UBC835、UBC845, 均为 66.7%。每条引物可扩增出的条带为 5~19 条, 平均 12.6 条, 多态性条带 5~17 条, 平均 10.8 条 (表 2)。以上扩增产物的多态性数据表明, ISSR 标记检测仙茅遗传多样性的效率较高, 同时揭示了仙茅种质资源具有丰富的遗传多样性。

2.2 遗传距离分析

用 TREECONW 软件计算供试材料间的遗传距离 (D) (表 3)。结果表明, 25 份仙茅的遗传距离平均为 0.287 5, 在 0.177 2~0.403 0, 变化范围较大, 其中 4 与 13 种质的亲缘关系最远, 遗传距离为 0.403 0; 18 与 23 种质的亲缘关系最近, 遗传距离为 0.177 2。多数地理位置相近的种质间遗传距离较小, 如 14 与 15 ($D=0.188\ 8$)、16 与 17 ($D=0.179\ 5$)、12 与 20 ($D=0.184\ 2$)、9 与 11 ($D=0.186\ 2$) 等。也

M 1 —————→ 25



M-Marker

图 1 ISSR 引物 UBC842 的扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification using Primer UBC842

有部分种质不符合上述原则, 如 5 与 6 ($D=0.257\ 6$)、8 与 25 ($D=0.333\ 3$)、18 与 19 ($D=0.271\ 5$) 等。地理位置相距不远的同一地区, 由于生长环境的差异, 其遗传距离相差较大, 如 20 与 10 遗传距离为 0.267 6, 而 20 与 12 的遗传距离为 0.184 2; 同为松林, 20 与 16 的遗传距离为 0.197 5, 10 与 3 的 0.365 1, 20 与 23 的遗传距离为 0.259 7。

2.3 聚类分析

用 UPGMA 法构建 25 份不同产地仙茅种质的亲缘关系树状图 (图 2)。供试材料首先聚为两大类 (I 和 II): 第 I 大类最为混杂, 包括 23 份种质; 第 II 大类仅 2 份种质, 均来源于云南地区。第 I 大类可分为 2 个亚类 (A、B 和 C): A 亚类包括 16 份种质, 大多来源于云南、四川、贵州; B 亚类中的

表 3 样品间的遗传距离
Table 3 Genetic distance among different materials

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	0.000 0																								
2	0.284 6	0.000 0																							
3	0.366 7	0.313 0	0.000 0																						
4	0.304 4	0.365 1	0.365 9	0.000 0																					
5	0.252 0	0.283 6	0.358 8	0.333 3	0.000 0																				
6	0.338 8	0.348 5	0.348 8	0.322 6	0.257 6	0.000 0																			
7	0.276 9	0.361 7	0.304 4	0.323 3	0.234 0	0.208 6	0.000 0																		
8	0.283 3	0.328 2	0.375 0	0.317 1	0.328 2	0.379 8	0.318 8	0.000 0																	
9	0.252 0	0.253 7	0.313 0	0.381 0	0.328 4	0.318 2	0.276 6	0.343 5	0.000 0																
10	0.271 2	0.302 3	0.365 1	0.305 8	0.255 8	0.354 3	0.308 8	0.301 6	0.317 8	0.000 0															
11	0.313 4	0.310 3	0.253 5	0.372 3	0.282 8	0.286 7	0.263 2	0.323 9	0.186 2	0.285 7	0.000 0														
12	0.281 3	0.309 4	0.294 1	0.328 2	0.251 8	0.299 3	0.274 0	0.308 8	0.237 4	0.298 5	0.266 7	0.000 0													
13	0.313 0	0.352 1	0.280 6	0.403 0	0.239 4	0.314 3	0.261 7	0.338 1	0.281 7	0.328 5	0.241 8	0.265 3	0.000 0												
14	0.296 0	0.279 4	0.323 3	0.312 5	0.250 0	0.298 5	0.328 7	0.278 2	0.308 8	0.267 2	0.306 1	0.219 9	0.277 8	0.000 0											
15	0.261 5	0.319 2	0.376 8	0.308 3	0.319 2	0.295 0	0.324 3	0.318 8	0.262 4	0.308 8	0.315 8	0.232 9	0.288 6	0.188 8	0.000 0										
16	0.278 2	0.277 8	0.305 0	0.323 5	0.263 9	0.267 6	0.271 5	0.290 8	0.263 9	0.323 7	0.225 8	0.221 5	0.223 7	0.205 5	0.192 1	0.000 0									
17	0.303 7	0.301 4	0.342 7	0.318 8	0.287 7	0.319 4	0.333 3	0.272 7	0.301 4	0.276 6	0.235 7	0.231 8	0.259 7	0.229 7	0.189 5	0.179 5	0.000 0								
18	0.300 0	0.231 8	0.337 8	0.328 7	0.271 5	0.288 6	0.303 8	0.310 8	0.271 5	0.287 7	0.234 6	0.218 0	0.295 6	0.215 7	0.227 9	0.205 0	0.202 5	0.000 0							
19	0.284 6	0.268 7	0.297 7	0.365 1	0.298 5	0.318 2	0.305 0	0.313 0	0.238 8	0.379 8	0.269 0	0.280 6	0.323 9	0.279 4	0.290 8	0.222 2	0.232 9	0.271 5	0.000 0						
20	0.250 0	0.224 5	0.319 4	0.323 7	0.265 3	0.269 0	0.259 7	0.250 0	0.292 5	0.267 6	0.278 5	0.184 2	0.264 5	0.208 1	0.220 8	0.197 5	0.195 0	0.207 3	0.306 1	0.000 0					
21	0.259 8	0.318 8	0.303 7	0.369 2	0.289 9	0.338 2	0.310 3	0.288 9	0.275 4	0.338 4	0.261 7	0.216 8	0.274 0	0.285 7	0.282 8	0.256 8	0.253 3	0.277 4	0.246 4	0.231 8	0.000 0				
22	0.252 0	0.268 7	0.313 0	0.349 2	0.313 4	0.363 6	0.276 6	0.267 2	0.283 6	0.317 8	0.269 0	0.366 9	0.323 9	0.323 5	0.305 0	0.277 8	0.287 7	0.258 3	0.268 7	0.306 1	0.304 4	0.000 0			
23	0.261 5	0.276 6	0.304 4	0.368 4	0.262 4	0.309 4	0.256 8	0.289 9	0.205 7	0.294 1	0.197 4	0.246 6	0.248 3	0.258 7	0.297 3	0.218 5	0.268 0	0.177 2	0.262 4	0.259 7	0.241 4	0.205 7	0.000 0		
24	0.311 5	0.353 4	0.276 9	0.376 0	0.323 3	0.374 1	0.271 4	0.292 3	0.323 3	0.343 8	0.319 4	0.289 9	0.276 6	0.274 1	0.328 6	0.300 7	0.337 9	0.266 7	0.338 4	0.301 4	0.299 3	0.263 2	0.242 9	0.000 0	
25	0.291 3	0.304 4	0.259 3	0.353 9	0.304 4	0.279 4	0.337 9	0.333 3	0.275 4	0.368 4	0.288 6	0.244 8	0.301 4	0.242 9	0.255 2	0.256 8	0.280 0	0.264 5	0.275 4	0.298 0	0.281 7	0.304 4	0.269 0	0.299 3	0.000 0

4 份种质有 3 份来源于四川, 另一份来源于贵州; C 亚类较为混杂, 3 份种质分别来源于四川、云南和重庆。从大区域看聚类结果, 仙茅种质之间的亲缘关系与地理分布无显著相关性, 如云南的 8 份种质并未明显地聚为一类, 而是分散在 3 个类群中; 四川的 8 份种质亦如此。但来源于同一地区的部分种质仍聚在同一类中, 如 5、6 和 7 地理位置较近, 均明显地聚在 B 亚类中, 呈现出一定的地域性分布规律; 在一些小分支中, 地理相关性较为明显, 如 14 与 15、16 与 17、12 与 20、9 与 11、18 与 23 均聚在一起。综上所述, 25 份不同产地仙茅种质间的亲缘关系较为复杂, 即不同地区材料之间存在着明显的遗传差异, 但也有同一地区内的材料表现出了明显的遗传分化。

3 讨论

遗传多样性一般是指种内的遗传差异水平, 反映一个物种适应环境的能力及其被改造和利用的潜力。从分子水平上探讨仙茅遗传多样性的来源、类型和特点, 能为合理地保护与利用仙茅资源提供有用的信息。本实验应用筛选到的 14 条 ISSR 引物在 25 份不同产地野生仙茅资源中检测到了较丰富的遗传多态性, 平均多态率达到 85.8%, 说明仙茅具有较强的区域适应能力和进化潜力, 进一步开发和选育的空间比较大。仙茅较高的遗传多样性可能与其繁殖方式有关。仙茅为一年生草本植物, 具有种子繁殖和根茎繁殖 2 种繁育方式。野生仙茅在原始生境没有被人干扰的情况下, 能基本上靠这两种繁殖方式维持种群较高的遗传多样性: 种子繁殖为

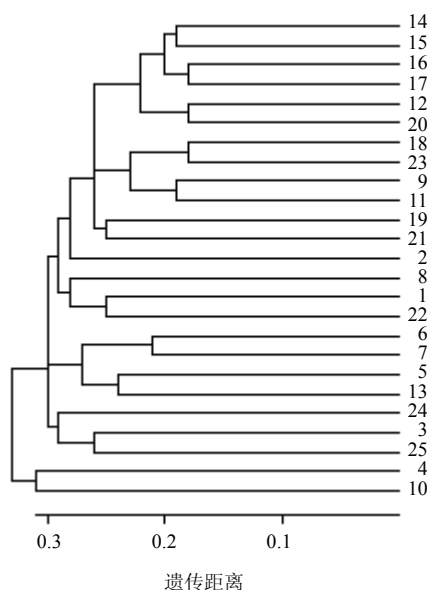


图 2 25 个不同产地仙茅种质的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of *C. orchioideis* from 25 germplasmic resources

种群间的基因重组提供了机会,有助于维持个体和种群的遗传多样性;根茎繁殖又确保了遗传稳定性,同时减少了遗传漂变。

遗传距离分析显示,25 份仙茅的遗传距离变化幅度较大(0.177 2~0.403 0),反映出仙茅各种质间的遗传基础较宽,存在较大的遗传变异性,蕴藏着丰富的基因资源。分析与仙茅野生群落的分布格局有关。从野外调查发现,仙茅的分布格局为集群分布,居群间由于群落、土壤、地形等的差异,具有空间分布间断性。仙茅各个居群由于所处的生态环境和群落物种结构的差异,在长期的群落形成、进化和演变中,为适应特定的生态条件,形成不同遗

传结构和遗传差异的仙茅种群。从亲缘关系树状图中也可看到这点:一方面,部分种质呈现出明显的区域特点,反映了地理隔离产生的生态型差异;另一方面,有些材料并没有按来源地明显地分布在相应的类群中,这种现象产生的原因可能是小生境存在一定的相似性。

参考文献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] 张忠廉,唐德英,张丽霞,等. 珠子草遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2125-2129.
- [3] 欧立军,颜 旺,廖亚西,等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. *中草药*, 2011, 42(2): 353-357.
- [4] 刘振丽,宋志前,孙明杰,等. 不同地区仙茅中仙茅苷含量测定及酒炙后仙茅苷含量变化 [J]. *中成药*, 2007, 29(3): 397-398.
- [5] 王任翔,李 红,谢 强,等. 药用植物仙茅的组织培养及快繁体系的建立 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(21): 9881-9882.
- [6] 吴远文. 仙茅与伪品的形态组织学及理化鉴别 [J]. *中药材*, 2006, 29(6): 553-554.
- [7] 陈大霞,李隆云,李泉森,等. 仙茅属植物 SRAP 反应体系优化的研究 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(6): 191-195.
- [8] 李隆云,陈大霞,秦松云,等. 仙茅属植物七个国产种的 SRAP 遗传关系研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(2): 117-120.
- [9] 李隆云,陈大霞,李泉森. 仙茅随机扩增多态性 DNA 反应体系的优化 [J]. *中国药房*, 2011, 22(7): 654-657.
- [10] 李隆云,陈大霞,钟国跃,等. 我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 980-984.