

ISSR 分析 3 种类型黄连的遗传多样性和遗传结构

陈大霞^{1,2,3}, 王钰^{1,2,3}, 张雪^{1,2,3}, 瞿显友^{1,2,3}, 李隆云^{1,2,3*}

1. 重庆市中药研究院中药种植研究所, 重庆 400065
2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065
3. 重庆市黄连工程技术研究中心, 重庆 400065

摘要: 目的 研究 3 种类型黄连的遗传多样性和遗传结构。方法 对 3 种类型黄连的 90 个单株进行 ISSR 分析, 运用 POPGENE 1.31 软件计算相关参数。结果 22 个引物共检测到 164 个位点, 其中 108 个为多态位点; 黄连 3 种类型具有较丰富的遗传多样性, 在物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 65.85%, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.229 8, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.144 0, 物种水平 Shannon's 多样性信息指数 (H_{sp}) 为 0.230 2; 在类型水平上, PPB 为 55.08%, N_e 为 1.218 9, H 为 0.136 0, 类型水平 Shannon's 多样性信息指数 (H_{pop}) 为 0.215 1。Nei's 基因多样性指数计算的类型间遗传分化系数与 Shannon's 类型分化系数分别为 0.056 1 和 0.065 2, 均说明大部分遗传变异存在于类型内; ISSR 标记检测到类型间存在着广泛的基因流 ($N_m=8.405 4$), 遗传分化程度较低; 两两类型间的 Nei's 遗传一致度 (I) 的范围为 0.983 1~0.989 7; 根据 Nei's 遗传距离进行各类型间的 UPGMA 聚类, 基于 ISSR 分子标记的聚类结果与形态分类基本一致。结论 3 种类型的黄连遗传多样性较高, 为新品种的培育提供了丰富的遗传基础。

关键词: 黄连; 遗传多样性; 遗传结构; 基因流; ISSR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1595-04

Analysis on genetic diversity and genetic structure among three types of *Coptis chinensis* by ISSR

CHEN Da-xia^{1,2,3}, WANG Yu^{1,2,3}, ZHANG Xue^{1,2,3}, QU Xian-you^{1,2,3}, LI Long-yun^{1,2,3}

1. Institute of Material Medical Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
2. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
3. Chongqing Engineering Research Center of *Coptis*, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity and genetic structure among three types of *Coptis chinensis* by ISSR. **Methods** Ninety individuals of the three types of *C. chinensis* were employed for inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. The parameters were calculated by POPGENE 1.31. **Results** A total of 164 bands were amplified by 22 primers, among which 108 were polymorphic; A relatively high level of genetic diversity was revealed at species level: PPB = 65.85%, $N_e = 1.229 8$, $H = 0.144 0$, and $H_{sp} = 0.230 2$; while at type level, PPB = 55.08%, $N_e = 1.218 9$, $H = 0.136 0$, and $H_{pop} = 0.215 1$; The Nei's coefficient of genetic differentiation was 0.056 1, which was consistent with the Shannon's coefficient of genetic differentiation (0.065 2). Most of the genetic variation existed among types; The gene flow ($N_m = 8.405 4$) was high among cultivars, indicating that the degree of genetic differentiation was lower; Genetic similarity coefficient (I) changed from 0.983 1 to 0.989 7. By UPGMA clustering analysis and Nei's genetic distance, the cluster analysis based on ISSR and classification of morphology were almost the same. **Conclusion** The relatively high genetic diversity of *C. chinensis* provides the basis for breeding new varieties.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; genetic diversity; genetic structure; gene flow; ISSR

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为毛茛科半阴性多 之一, 具有清热燥湿、泻火解毒的功效。我国目前年生草本植物, 以根茎入药, 是我国传统常用中药 黄连药材多来源于栽培长期以来, 由于地区间的引

收稿日期: 2012-01-10

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2009ZX09308-002, 2012ZX09304006); 国家科技支撑计划资助项目 (2011BAI13B02-1); 国家科技攻关计划资助项目 (2004BA721A32)

作者简介: 陈大霞 (1968—), 女, 重庆人, 副研究员, 硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。

*通讯作者 李隆云 Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

网络出版时间: 2012-07-10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120710.1107.002.html>

种交流，导致黄连栽培群体类型多样，群体内各单株间外部形态参差不齐，产量差异显著。有研究表明不同类型之间的遗传差异与药材的产量和质量有一定的相关性^[1-2]。本研究对重庆市石柱黄连规范化种植（GAP）示范基地的 3 种具有育种潜力的常见类型进行了形态调查，并采用 ISSR 标记技术探讨其遗传多样性状况和遗传结构特点，以期科学合理地保护和利用现有的黄连资源提供遗传学依据。

1 材料

黄连的 3 种类型纸叶型（ZY）、细叶型（XY）、花叶型（HY），种植于重庆市石柱黄连 GAP 示范基地，由重庆市中药研究院瞿显友研究员鉴定均为 4 年生黄连 *Coptis chinensis* Franch.。根据均匀分布、随机取样原则进行采样。采样时间为 2010 年 5 月，每种类型各取 30 个单株。采集植株上的健康幼嫩叶片，洗净、晾干后，放入装有硅胶的自封

袋，干燥，备用。

2 方法

2.1 DNA 的提取

取黄连供试材料，采用天根试剂盒提取基因组 DNA，1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量，并用 Smart Spee™3000 型分光光度计（BIO-RAD 公司）测定其质量浓度，将样品稀释为 40 ng/μL，置-20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 ISSR 分析

ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学（UBC）公布的序列，由上海生工生物工程有限公司合成。共选用了 22 条扩增产物清晰、重复性好且多态性条带相对较高的引物用于正式 PCR 扩增，其中 16 条采用已有文献报道的^[3]，另外 6 条是随机抽取 2 个单株（HY 型和 XY 型各 1 个）筛选出来的。变性温度根据引物的退火温度值变化 1~3 °C。具体引物、序列及退火温度见表 1。

表 1 ISSR 引物序列、退火温度及扩增结果

Table 1 Sequence, annealing temperature, and amplification of ISSR primers

引物	序列	退火温度 / °C	总带数	多态性带数	引物	序列	退火温度 / °C	总带数	多态性带数
UBC807	(AG) ₈ T	53.5	10	7	UBC840	(GA) ₈ YT	52.0	6	5
UBC810	(GA) ₈ T	48.0	2	1	UBC842	(GA) ₈ YG	57.0	8	6
UBC811	(GA) ₈ C	53.5	7	5	UBC844	(CT) ₈ RC	53.5	5	2
UBC815	(CT) ₈ G	48.0	16	14	UBC847	(CA) ₈ RC	55.0	7	5
UBC817	(CA) ₈ A	53.5	7	3	UBC848	(CA) ₈ RG	57.0	6	4
UBC818	(CA) ₈ G	57.0	7	4	UBC852	(TC) ₈ RA	53.5	7	4
UBC822	(TC) ₈ A	48.0	9	4	UBC853	(TC) ₈ RT	53.5	12	10
UBC823	(TC) ₈ C	53.5	6	2	UBC855	(CA) ₈ YT	57.0	9	5
UBC824	(TC) ₈ G	53.5	7	6	UBC857	(AC) ₈ YG	53.5	6	3
UBC825	(AC) ₈ T	53.5	5	4	UBC866	(CTC) ₆	57.0	6	4
UBC828	(TG) ₈ A	53.5	8	6	UBC891	HVH(TG) ₇	53.5	8	4

R = (A, G) Y = (C, T) H = (A, C, T) (i.e. not G) V = (A, C, G) (i.e. not T)

ISSR 反应体系和扩增程序^[4]：在 25 μL 体系中，内含 1×PCR 缓冲液、1.5 mmol/L Mg²⁺、200 μmol/L dNTP、0.4 μmol/L 引物、40 ng 模板、1U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min，35 个循环：94 °C 变性 30 s，48~57 °C 复性 1 min，72 °C 延伸 1.5 min，循环结束后 72 °C 延伸 7 min，4 °C 保存。扩增在 S1000™ Thermal Cycler（BIO-RAD）上进行。

扩增产物加入染料在 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳分离。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，在 Gel Doc XR 凝胶成像系统

（BIO-RAD）上观察、照相、保存。

2.3 数据统计与分析

应用 POPGENE 1.31 软件在物种水平和类型水平上分别估测下列遗传参数：多态位点百分率（PPB）、Shannon’s 多样性信息指数（H₀，在物种水平上为 H_{sp}，在类型水平上为 H_{pop}）、Nei’s 基因多样性指数（H）、平均每个位点的观察等位基因数（N_a）、平均每个位点的有效等位基因数（N_e）、总的基因多样性（H_t）、类型内基因多样性（H_s）、基因分化系数（G_{st}）、基因流（N_m）和 Nei’s 遗传距离（D）和

遗传一致度 (I)。

3 结果与分析

3.1 黄连 3 种类型植物形态差异

重庆市石柱黄连 GAP 示范基地的 3 种类型黄连在植株外部形态上存在一定的差异, 其主要特征见表 2。

3.2 黄连 3 种类型的遗传多样性

采用 22 个扩增谱带清晰并呈现多态性的引物对 90 份样品进行 ISSR-PCR 扩增检测。ISSR 标记的多态性见表 3。每条引物产生 2~16 条扩增带, 平均每个引物产生 10.9 条扩增带和 7.2 条多态性带。在物

种水平上 22 条引物共检测到 164 条扩增带, 其中有 108 条呈多态性, PPB 为 65.85%。在类型水平上, 各个类型的 PPB 差别不大, 在 50.00%~57.93%, 平均值为 55.08%, 其中 HY 型的遗传多样性水平最低, ZY 型与 XY 型基本一致, 稍高于 HY 型。以上分析表明, 黄连 3 种类型的遗传多样性较为丰富。除 PPB 外, POPGENE 软件分析的其他参数 (表 3) 也表明黄连 3 种类型的遗传多样性较为丰富。在物种水平上, $N_e=1.229\ 8$, $H=0.144\ 0$, $H_{sp}=0.230\ 2$; 在类型水平上, 平均每个位点的 $N_e=1.218\ 9$, $H=0.136\ 0$, H_{pop} 为 0.201 0~0.225 7, 平均 H_{pop} 为 0.215 1。

表 2 黄连 3 种类型的形态特征

Table 2 Morphology for three types of *C. chinensis*

类型	形态特征
ZY 型	叶面无角质, 无光泽, 绿黄色, 质地较薄; 叶缘具粗齿或细齿; 中裂片与侧裂片略等长, 中裂片上的小裂片多深裂, 裂片间空隙较宽; 花被多为紫色, 少黄花被; 果实多黄绿色或黄色
XY 型	叶面有角质, 呈油润光泽, 深绿色; 叶缘多具细齿; 中裂片与侧裂片略等长或长, 中裂片几近全裂, 小裂片间的空隙大; 花被多为紫色或淡色; 果实为黄绿色或淡紫色
HY 型	叶面有角质, 呈油润光泽, 深绿色; 叶脉交汇处有不规则黄色斑块, 叶缘多具粗齿; 中裂片与侧裂片略等长, 小裂片多深裂, 裂片间隙较宽; 花被为紫色, 黄绿色; 果实为黄绿色或紫色

表 3 黄连 3 种类型的遗传多样性

Table 3 Analysis on genetic diversity among three types of *C. chinensis*

类型	n	K	PPB / %	N_a	N_e	H	H_{pop}
ZY	30	95	57.93	1.579 3	1.219 0	0.137 4	0.218 6
XY	30	94	57.32	1.573 2	1.231 3	0.142 9	0.225 7
HY	30	82	50.00	1.500 0	1.206 3	0.127 6	0.201 0
平均值		90	55.08	1.550 8	1.218 9	0.136 0	0.215 1

n -样本数量 K -多态位点数

n -sample number K -polymorphic sites

3.3 黄连 3 种类型的遗传分化与基因流

用 POPGENE 计算出的遗传变异分析结果表明, 3 种类型 H_t 为 0.144 0, 其中 H_s 为 0.135 9, 类型间的基因多样性 ($D_{st}=H_t-H_s$) 为 0.008 1, N_m 为 8.405 4, 基因流较大, 说明类型间存在着很强的基因交流, 遗传漂变不会引起遗传分化。

G_{st} 为 0.056 1, 表明有 5.61% 的遗传变异存在于类型间, 94.39% 的遗传变异存在于类型内, 类型内的遗传分化远大于类型间的分化。根据 Shannon's 多样性指数的分析结果 (物种水平上 $H_{sp}=0.230\ 2$, 类型水平上 $H_{pop}=0.215\ 1$) (表 3), 计算出 Shannon's 黄连类型分化系数 ($H_{sp}-H_{pop}$) / H_{sp} 为 0.065 6, 即有 6.56% 的遗传变异分布在类型间, 93.44% 的遗传变异分布在类型内部。2 种

方法的分析结果几乎是一致的, 仅存在微小的差异。两者均表明黄连不同类型间的遗传分化不明显, 遗传变异主要存在于类型内。

3.4 遗传距离和遗传一致度

用 POPGENE 计算出了黄连 3 种类型间的 Nei's I 介于 0.983 1~0.989 7, 平均为 0.986 0, 遗传距离范围为 0.010 4~0.017 0, 平均为 0.014 1。ZY 型与 HY 型之间的遗传一致度最低 ($I=0.983\ 1$), 遗传距离最远 ($D=0.017\ 0$)。ZY 型与 XY 型之间的遗传一致度最高 ($I=0.989\ 7$), 遗传距离最近 ($D=0.010\ 4$)。

4 讨论

本课题组曾采用 ISSR、SRAP 标记对栽培黄连种质资源的遗传多样性进行了研究, 2 种标记均表明栽培黄连的遗传多样性水平较低, 种质间的亲缘

关系较近 (ISSR 揭示的 PPB 为 48.1%, SRAP 为 43.48%)^[3,5]。本研究结果表明黄连 3 种类型的遗传多样性较为丰富: 在物种水平上, PPB 为 65.85%; 在类型水平上, HY 型的遗传多样性水平居中等水平, ZY 型和 XY 型遗传多样性差别不大, 稍高于 HY 型。HY 型产量高, 是非常宝贵的基因资源。遗传变异主要存在于类型内, 遗传分化不明显。植株间较为丰富的遗传差异为品种选育奠定了坚实的物质基础。因此, 在黄连育种工作中, 要充分考虑不同类型的优良性状, 合理地进行搭配组合。

对于植物尤其是种子植物来说, 花粉和种子是基因流的主要载体, 基因流的大小主要决定于花粉漂移或种子传播水平。在本研究中, 黄连不同类型间存在着较高水平的基因流 ($N_m=8.4054$), 推测与花粉扩散和人为的种子交流有很大关系: 黄连的繁育系统为兼性异交, 自花和异花授粉同时存在, 后代易出现分化现象, 植株外部形态参差不齐, 且单株黄连的产量与质量也有一定的差异^[1-2]。黄连授粉特性的这种复杂性加大了品系纯化的难度, 杂种性状稳定较慢, 加上黄连为多年生药材, 所以育种年限较长; 黄连的繁殖方式以种子繁殖为主, 不同地区间种子介异的基因流频繁, 因而遗传分化较小。黄连主要产区内的种源不是一成不变, 相互间引种、换种频繁, 即使在偏僻的山区也存在种子交流的行

为。已有研究者曾对四川黄连的生产现状进行调查, 结果表明四川盆地周边近 40 个县以及湖北、陕西、贵州、福建、云南等近 10 个省从石柱引种黄连^[6-7]。不同地区黄连种质资源遗传多样性的分子评价结果显示聚类结果与空间距离无显著相关性, 从分子水平上证实黄连种子交流的现状^[3,5]。目前, 在重庆石柱就有一个专业的黄连交易市场, 是黄连药材和种子交易的集散地。每年 5 月种子成熟时节, 周边的种子均在此交易, 各地引种时也大多在此购买, 这些因素促进了黄连种子介导的基因流。

参考文献

- [1] 朱 强, 王有为, 齐海涛, 等. 不同品系黄连产量和质量的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1866-1869.
- [2] 濮社班, 张字和. 黄连生长状况及生物碱的个体差异 [J]. 中草药, 1999, 30(5): 375-377.
- [3] 陈大霞, 李隆云, 彭 锐, 等. 黄连种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1937-1939.
- [4] 陈大霞, 李隆云, 鲁 成, 等. 黄连 ISSR 反应条件优化的研究 [J]. 植物研究, 2007, 27(1): 77-81.
- [5] 陈大霞, 李隆云, 瞿显友, 等. 栽培黄连群体遗传关系的 SRAP 分析 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1552-1556.
- [6] 范俊安, 易尚平, 张爱军, 等. 川产道地药材受 GBS 制约效应 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(1): 12-14.
- [7] 范俊安, 李 军, 易尚平. 四川省黄连生产现状调查 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18(9): 530-531.