

不同产地野生玉竹种质资源多样性与亲缘关系的 ISSR 分析

卜 静, 王冬梅*, 李登武

西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100

摘 要: **目的** 研究中国不同居群野生玉竹种质资源的遗传多样性。**方法** 选取我国 11 个不同居群的野生玉竹样品和 1 个居群的栽培样品进行 ISSR 分析, Popgene 32 及 Ntspc-2.1 软件分析处理数据。**结果** 通过筛选得到 10 条 ISSR 引物, 扩增得到 115 条带, 其中 108 条为多态性条带, 多态性条带百分率为 93.38%; Nei's 基因多样性 (H) 为 $0.432\ 1 \pm 0.084\ 1$, Shannon 信息指数 (I) 为 $0.619\ 7 \pm 0.100\ 5$, 遗传距离 (GD) 变异为 $0.128\ 9 \sim 0.496\ 5$; 利用 UPGMA 法构建分子树状图, 可将 12 个居群聚合为两大类。**结论** 不同产地野生玉竹种间存在较高的多态性, 遗传多样性较为丰富; 野生玉竹的遗传多样性高于栽培居群的遗传多样性, 可能与栽培方式和环境因素有关; 药用植物玉竹对环境变化的适应能力强, 地理来源相同的野生居群和栽培居群先行聚合, 与其种质间的亲缘关系较近有关; 聚类结果可以部分反映地理分布的特点, 为种质资源的鉴定打下良好基础。

关键词: 玉竹; ISSR; 遗传多样性; 亲缘关系; 栽培方式; 环境因素

中图分类号: R282.23

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)09-1824-05

ISSR analysis on diversity and genetic relationship in germplasm resources of wild *Polygonatum odoratum* from different habitats

BU Jing, WANG Dong-mei, LI Deng-wu

College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of wild *Polygonatum odoratum* from different habitats of China. **Methods** Eleven wild *P. odoratum* samples from different habitats and one cultivar were selected for ISSR analysis. Popgene 32 and Ntspc-2.1 softwares were used for data analyses. **Results** Ten ISSR primers were screened and 115 bands were amplified, among which 108 bands were polymorphic (PPB = 93.38%). Nei's gene diversity (H) was $0.432\ 1 \pm 0.084\ 1$, Shannon's genetic diversity (I) was $0.619\ 7 \pm 0.100\ 5$, and genetic distance (GD) among 12 populations ranged from $0.128\ 9$ to $0.496\ 5$. UPGMA was used for establishing dendrogram tree and 12 populations were clustered into two groups. **Conclusion** Higher polymorphism is observed from *P. odoratum* among different habitats. The genetic diversity of wild *P. odoratum* is higher than that of wild population, which is related with culture methods and environmental factors. *P. odoratum* has high adaptability to the environmental changes. Results show that wild and cultural *P. odoratum* from the same habitat cluster in advance, which is related to the near phylogenetic relationship among species. Cluster analysis could partly reflect the characteristic of geographical distribution and provide the reference for the identification of germplasm.

Key words: *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce; ISSR; genetic diversity; genetic relationship; cultural methods; environmental factors

简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是 1994 年由 Zietkiewicz 创建的一种简单序列重复间扩增多态性分子标记方法^[1], 目前, 利用 ISSR 技术已对银杏、地黄、珠子草、党参、

砂仁等药用植物进行了 DNA 指纹图谱构建、真伪鉴定、种质遗传多样性和亲缘关系等研究报道^[2-7]。

玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 是百合科黄精属多年生草本植物, 是我国传统中药, 具

收稿日期: 2012-02-21

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项 (200904004); 陕西省科技攻关项目 (2009K19-06); 西北农林科技大学“青年学术骨干支持计划” (Z111020902)

作者简介: 卜 静, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为药用植物生态学。E-mail: bujing19860304@163.com

*通讯作者 王冬梅 Tel: (029)87082210 E-mail: dmwli@163.com

网络出版时间: 2012-07-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120706.1741.014.html>

有养阴润燥、除烦、止渴等功效,治疗热病伤阴、消谷易饥等症。玉竹是一种生理活性显著,极具开发利用价值的药用植物资源^[8-11]。近年来,有学者运用分子标记法对玉竹也进行了初步探讨,周晔等^[12-13]、王润玲等^[14]、李钟等^[15]、刘塔斯等^[16]、林丽美等^[17]分别从 RAPD 和 ISSR 技术方面对玉竹和易混淆品黄精、小玉竹进行了鉴定;潘清平等^[18]对玉竹进行了品种间的鉴定;陈玉秀等^[19]采用 ISSR 标记对湖南的栽培品种玉竹的遗传多样性进行了初步分析。但对不同产地野生玉竹种质资源遗传多样性的研究尚未见报道。本研究以我国 12 个不同居群的新鲜玉竹为材料,采用 ISSR 标记技术对栽培和野生状态下的玉竹进行遗传多样性及亲缘关系分析。

表 1 材料来源

Table 1 Sources of materials

编号	名称	采集地	纬度 (N)	经度 (E)	海拔 / m
1	玉竹 (野生)	陕西省渭南龙门鸭沟	35°61'	110°58'	1 128
2	玉竹 (野生)	陕西省商南腰庄大西沟	33°53'	110°88'	1 060
3	玉竹 (野生)	陕西省宝鸡凤县紫柏山	33°37'	106°34'	2 012
4	玉竹 (野生)	吉林省临江市卧虎山	41°48'	126°56'	478
5	玉竹 (野生)	山西省娄烦县娄儿沟	37°54'	113°35'	1 943
6	玉竹 (栽培)	湖南省新宁县回龙寺镇	26°39'	111°05'	557
7	玉竹 (野生)	陕西省太白山大殿	34°05'	107°31'	2 350
8	玉竹 (野生)	陕西省太白山菜园沟	34°26'	108°95'	1 400
9	玉竹 (野生)	湖北省兴山县黄良镇吴家湾	31°15'	110°49'	915
10	玉竹 (野生)	湖南省新宁县紫云山	26°39'	111°05'	850
11	玉竹 (野生)	陕西省宁陕县牛保广货街	33°32'	108°34'	1 090
12	玉竹 (野生)	陕西省太白山中山寺	34°30'	108°77'	1 200

1.2 仪器

PTC—200 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司), Gel—2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 紫外分光光度计 (Pharmaspec UV—2000), 湘仪离心机 TG16—W 微量高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), DYY—10C 型电泳仪 (北京六一仪器厂), DYY—12 型电脑三恒多用电泳仪 (北京市六一仪器厂), 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

2 方法

2.1 DNA 的提取

每个居群选取 10 株样本, 切下新鲜幼嫩根茎, 等量混合后取样。DNA 的提取参照改良的

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自陕西、山西、湖南、湖北、吉林 5 省, 共 12 个居群, 材料信息见表 1。经西北农林科技大学林学院李登武教授鉴定为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce。采集新鲜健康玉竹根茎, 用冰盒保存, 带回实验室于 -80 °C 冰箱低温保存备用, 在采集的同时记录相关的地理参数。所用植物均采于 2010 年 9~11 月。

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 均购自上海生工生物工程公司; ISSR 引物由华大基因合成; Tris 同 EDTA 为 Amresco 分装; 琼脂糖 (进口分装); PVP (Sigma 公司); β -巯基乙醇 (Sigma 公司), 其余试剂均为国产分析纯。

CTAB 法^[19]并稍加改进。在其第 2 步的 CTAB 裂解液中多加入 2% PVP; 在第 3 步完成后, 添加一个步骤, 即转移上层清液至新离心管中, 加入 1/10 体积的 10×CTAB/NaCl, 水浴 10 min, 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 上下轻缓颠倒, 混匀 10 min, 以 10 000 r/min 离心 15 min。

2.2 PCR 扩增及引物筛选

由华大基因根据加拿大哥伦比亚大学公布的第 9 套引物序列合成 100 条 ISSR 引物^[20]。对每个居群随机选取的 2 个样品 DNA 进行 PCR 扩增, 筛选出 DNA 条带清晰、多态性强、重复性好的用于 12 个居群样本分析的 10 个引物。每个引物的扩增重复 2 次, 得到可重复的数据。PCR 反应在 PTC—200 型

PCR 仪上进行。ISSR-PCR 反应体系: $1\times$ buffer、 Mg^{2+} 2 mmol/L、dNTPs 0.2 μ mol/L、引物 10 μ mol/L、Taq 酶 1.0 U、模板 DNA 15 ng、超纯水加至 20.0 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 52.5 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2.3 数据处理与统计分析

ISSR 为显性标记, 同一引物扩增产物中, 电泳率一致的条带被认为具有同源性^[21], 按照电泳图谱中同一位置上 DNA 条带有或无赋值, 有带(显性)记为“1”, 无带(隐性)记为“0”, 强带和弱带的赋值均为 1, 对于多态性位点, 仅采用在重复性试验中稳定出现的差异带用于数据分析, 以此作为数据记录的标准形成 0~1 的二元矩阵录入计算机。

用 Popgene 32 软件在 Hardy-Weinberg 平衡假设条件下计算遗传多样性参数: 多态位点百分率(percentage of polymorphic loci, PPL)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)、Shannon 信息指数(Shannon's Information index, I)、遗传距离(GD), 利用 Ntsyspc-2.1 软件, 采用 UPGMA 聚类分析, 建立样品间的亲缘关系聚类树状图。

3 结果与分析

3.1 基因组 DNA 扩增产物的多态性分析和遗传多样性分析

本研究筛选出 10 条条带清晰、重复性和稳定性好且多态性相对较多的引物, 用于全部 DNA 样品进行 ISSR 多态性检测, 部分引物扩增结果见图 1。从 ISSR 扩增条带统计结果来看(表 2), 10 个引物共扩增出 115 条清晰、可重复的 DNA 带, 片段大小在 100~2 000 bp, 每个引物检测到的位点在 7~16 个, 平均每个引物可扩增出 12 条带。有 108 条呈多态性, 占所观察到的总扩增带的 93.38%。同一

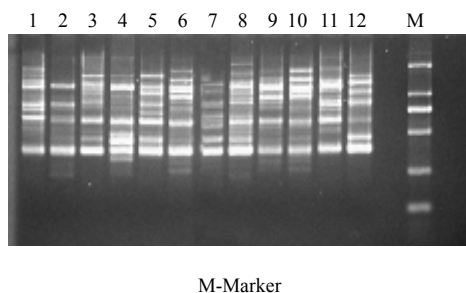


图 1 引物 UBC827 对玉竹样品的扩增谱带
Fig. 1 ISSR amplification bands of *P. odoratum* by Primer UBC827

表 2 ISSR 引物序列及扩增结果

Table 2 ISSR primer sequences and amplification results

引物名	序 列	总带数	多态性带数	多态性率 / %
UBC818	(CA) ₈ G	15	14	93.33
UBC822	(TC) ₈ A	9	8	88.89
UBC824	(TC) ₈ G	11	11	100
UBC835	(AG) ₈ YC	16	14	87.50
UBC843	(CT) ₈ RA	10	10	100
UBC844	(CT) ₈ RC	11	10	90.91
UBC845	(CT) ₈ RG	13	13	100
UBC853	(TC) ₈ RT	8	7	87.50
UBC854	(TC) ₈ RG	7	6	85.71
UBC857	(AC) ₈ YG	15	15	100
平均		11.5	10.8	93.38

引物在不同供试材料也具有不同的扩增谱带。通过以上分析可知, 玉竹个体间具有同源性, 也表明其遗传背景相当复杂。

用 Popgene 32 分析软件对新鲜野生玉竹居群间的遗传多样性进行统计分析得出, $H=0.432\ 1\pm 0.084\ 1$, $I=0.619\ 7\pm 0.100\ 5$, 野生玉竹在物种水平上 PPL=94.13%。说明居群间存在较高的遗传多样性。这与陈玉秀^[19]研究的湖南栽培玉竹品种和部分野生玉竹所得出的结论一致。

3.2 聚类分析

采用 Nei's 遗传相似系数(GS)的计算方法, 得到 ISSR 标记扩增结果的相似性系数矩阵, 从而获得玉竹各种源地的 GD ($GD=1-GS$); 结合 UPGMA 法, 根据遗传相似系数建立玉竹种质资源的亲缘关系树形图, 结果显示, 12 个居群玉竹种质资源之间的遗传距离为 0.128 9~0.496 5; 最小为 0.128 9, 是 9 与 10, 说明二者的亲缘关系最近, 而这两个种源地的地理位置也较为靠近; 同为湖南省的 6 和 10 的遗传距离为 0.165 9, 其亲缘关系仅次于 9 和 10, 因为其种源相同, 栽培后并未产生明显的变异; 2 与 7 遗传距离最大(0.496 5); 其次为 4 和 11(0.465 0), 此两个种源地地理位置相对较远, 说明亲缘关系远, 有较大的遗传背景差异。可以看出, 玉竹个体间的遗传距离大不相同, 也说明各地理种源间的个体间遗传差异较大。

系统聚类树状图可直接反映 12 个居群的亲缘关系(图 2)。12 个不同产地的玉竹聚为两大类, 第 1 类包括 1、2 和 11, 6、10 和 9; 第 2 类为 3、5、7、8、12 和 4。从以上聚类结果可以看出各玉竹种

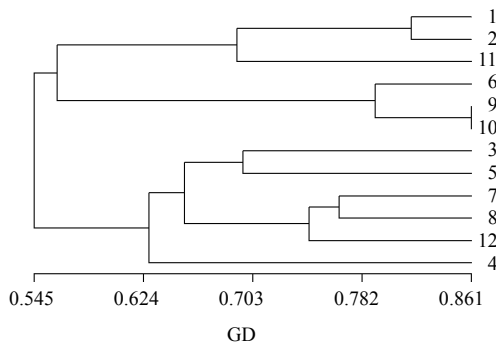


图2 12个玉竹居群的UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 12 populations of *P. odoratum*

质并未严格按地理界限聚在一起,仅部分来源于同一地区的玉竹种质聚在一起,出现“大杂居、小聚居”的现象,如1和2,10和9,8、7和12。采集样本时发现这些地区玉竹的生长环境具有一定的相似性,如采摘地区的海拔、气候、植被状况等,所以很有可能玉竹的种质受生态因子的影响较大,在进化过程中,基因产生了一定的变异。

4 讨论

ISSR作为一种具有较长引物序列、高稳定性、丰富结合位点的标记方法,结合了RAPD和SSR标记技术的优点,揭示出比RFLP/RAPD/SSR更多的多态性,能够提供更多的基因组DNA信息,可应用于药用植物种质鉴定、遗传多样性、进化与亲缘关系分析等方面^[22-23]。PCR扩增容易受到DNA模板的浓度与纯度、引物与dNTPs的用量、 Mg^{2+} 浓度、扩增程序与循环周期等诸多因素影响^[24],同一引物,对于不同的物种,退火温度可能不同,如Huang等^[25]用ISSR技术检测番薯时引物811、888的退火温度分别为53、52℃;Herrera等^[26]在运用ISSR技术检测葡萄时这2个引物所采用的退火温度均为55℃。退火温度不同,产生错配的程度也不相同。所以,需要进一步优化固定PCR反应的各种条件,以期实验得到较好的重复。

玉竹是一种传统中药,随着开发利用的不断扩展,需求量日益增大;但在开发过程中,却忽视了对其资源的保护,导致野生资源遭受毁灭性的破坏,造成原材料紧缺。所以,将野生玉竹变成高产、高质的家种尤显重要。

玉竹广泛分布于我国大部分地区,生于海拔500~3 000 m的林下或山野阴坡。目前对其种质资源的研究较少,资料信息比较匮乏,本研究只是对

全国部分种源进行了遗传多样性研究,在以后的研究中,应采集更多的样品,以提高实验的准确性,加强实验的深度。

利用ISSR技术对12个地区玉竹进行遗传多样性分析,PCR扩增图谱上存在明显的条带差异,说明ISSR技术可以从分子水平检测出不同产地野生玉竹的差异,在玉竹种质鉴定上有重要意义。同时多态性百分率为93.38%,表明不同产地玉竹具有较高的遗传多样性,各地理种源间的个体遗传差异较大,这可能与其具有很强的适应不同气候环境的能力密切相关。

在亲缘关系上,遗传距离越小,遗传一致性越大,药材间的亲缘关系也就越近,在所研究的12个产地的药材中,亲缘关系最近的是地理距离比较近的湖南、湖北的野生药材,遗传距离较大的是陕西省宁陕县和吉林省临江市的药材,地理距离相对比较远。在基于遗传分析的树系图上,聚类结果与地理分布并不完全一致,同一产区的药材并没有完全聚在一起,玉竹药材的遗传变异与地理分布没有呈现明显的相关性,表明地理距离在玉竹药材的遗传分化中可能并非主导因素,其遗传分化的因素还需要结合生殖生物学与生态学方面的研究给出科学的评价。

参考文献

- [1] Zietkiewicz E. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20: 176-183.
- [2] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的ISSR分析 [J]. *生物多样性*, 2003, 11(4): 276-287.
- [3] 沈永宝, 施季森, 赵洪亮. 利用ISSR DNA标记鉴定主要银杏栽培品种 [J]. *林业科学*, 2005, 41(1): 202-204.
- [4] 周延清, 景建州, 李振勇, 等. 怀地黄遗传多样性的ISSR鉴定 [J]. *中草药*, 2005, 36(2): 257-261.
- [5] 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.
- [6] 邱英雄, 傅承新, 吴斐捷. 明党参川明参群体遗传结构及分子鉴定的ISSR分析 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(7): 598-603.
- [7] 张忠廉, 李学兰, 杨春勇, 等. 砂仁遗传多样性的ISSR分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 570-574.
- [8] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [10] 黄兆胜. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [11] 晏春耕, 曹瑞芳. 玉竹的研究进展与开发利用 [J]. 中国现代中药, 2007, 9(4): 33-35.
- [12] 周 晔, 杨湘龙, 张 攻, 等. 八仙山产黄精和玉竹的鉴定 [J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(3): 361-364.
- [13] 周 晔, 唐 钺, 安适之, 等. ISSR 法鉴定中药玉竹与小玉竹 [J]. 中医医学报, 2006, 34(5): 7-9.
- [14] 王润玲, 唐 钺, 周 晔, 等. 玉竹及其掺伪品的 RAPD 鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1727-1729.
- [15] 李 钟. 用RAPD技术鉴别湖南道地药材玉竹 [D]. 长沙: 湖南中医学院, 2003.
- [16] 刘塔斯, 李 钟, 刘春林. 玉竹及其混淆品黄精的 RAPD 分析 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(10): 734-736.
- [17] 林丽美, 刘塔斯, 龚力民, 等. 药材玉竹 RAPD 反应体系的优化 [J]. 中南药学, 2006, 4(5): 383-385.
- [18] 潘清平, 周日宝, 陈玉秀, 等. 玉竹不同品种的 ISSR 分子鉴定 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(10): 28-30.
- [19] 陈玉秀. 玉竹品种鉴定及其种质遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2008.
- [20] 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.
- [21] 李 佳, 房敏峰, 周天华, 等. 主产区远志种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1881-1883.
- [22] 王明明, 宋振巧, 王建华. ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 134-136.
- [23] 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.
- [24] 余 艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19.
- [25] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relative in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050-1060.
- [26] Herrera R, Cares V, Wilkinson M J, *et al*. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and inter simple sequence repeat markers [J]. *Euphytica*, 2002, 124: 139-145.