基于 ISSR 的新疆贝母属植物遗传多样性研究

王果平，樊丛照，李晓瑾*，朱 军，贾晓光
新疆维吾尔自治区中药民族药研究所，新疆 乌鲁木齐 830002

摘 要：目的 通过对新疆贝母属植物进行遗传多样性分析，以期获得新疆贝母属不同种之间的遗传多态性。**方法** 应用琼脂糖凝胶电泳法结合 ISSR 分子标记，对所选材料进行遗传多样性与亲缘关系的综合分析。**结果** 2%琼脂糖凝胶电泳扩增总条带数为 185 条，其中多态性条带为 181 条，多态性条带比率（PPB）为 97.84%。基于 UPGMA 软件对 10 种贝母的遗传差异性分析表明，12 个 ISSR 引物可以将新疆贝母不同种之间遗传差异明显区分开来，其遗传相似系数范围在 0.37～0.80，以 0.50 为最低遗传相似系数，可将 10 种贝母分成 4 个大类。**结论** 揭示了 10 种贝母种质资源间的遗传多样性与亲缘关系，为新疆野生贝母属植物资源的收集和种间分类等提供理论依据。

关键词： 贝母属；ISSR；遗传多样性；聚类分析；相似系数
中图分类号： R282.12 **文献标志码：** A **文章编号：** 0253 - 2670(2013)07 - 0887 - 04
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.021

Genetic diversity analysis on plants in *Fritillaria* L. from Xinjiang based on ISSR

WANG Guo-ping, FAN Cong-zhao, LI Xiao-jin, ZHU Jun, JIA Xiao-guang
Xinjiang Institute of Chinese Traditional Medical and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, China

Abstract: Objective In order to gain genetic polymorphism among different species, the genetic diversity of the plants in *Fritillaria* L. from Xinjiang was analyzed. **Methods** Agarose gel electrophoresis and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis were used to investigate the genetic diversity and genetic relationship of the samples in *Fritillaria* L. from Xinjiang. **Results** Total 185 bands were amplified and detected by 2% agarose gel electrophoresis, including 181 polymorphic bands with the percentage of polymorphic bands (PPB) at 97.84%. Twelve ISSR primers could significantly separate different species of plants in *Fritillaria* L. from Xinjiang with genetic similarity coefficient (GS) ranged from 0.37 to 0.80 revealed by UPGMA analysis. Ten species in *Fritillaria* L. from Xinjiang were clustered into four groups using 0.50 as the lowest GS. **Conclusion** The results indicate that ISSR technique is useful in revealing the genetic diversity and genetic relationship among 10 species in *Fritillaria* L., which could provide a scientific basis for the resource collection and identification of the species in *Fritillaria* L. from Xinjiang.

Key words: *Fritillaria* L.; ISSR; genetic diversity; cluster analysis; similarity coefficient

贝母属 *Fritillaria* L. 植物入药历史悠久，川贝母等多种贝母属植物被誉为止咳润肺之“圣药”，随着中药市场的不断发展和人民日常生活的需要，贝母已成为价格最昂贵的根茎类中草药材之一。我国贝母属植物现有 40 种、9 变种，分布范围广，尤其以四川和新疆最为丰富，栽培历史久远，种间变异复杂，种间性状交叉普遍，遗传背景混淆不清。目前，有关贝母属的研究主要集中在群落生态[1]、形态解剖学[2]、有效成分[3]、药理[4]、遗传多样性[5-7]等方面，而对新疆贝母属植物遗传多样性的系统研究还未见报道。

ISSR 是近年发展起来的一类新型分子标记技术，结合了 SSR[8-9]和 RAPD[10]标记手段的优点。具有 RAPD 的操作简单，所需 DNA 量少，不需预知研究对象的基因组序列等优点，并具有 SSR 的稳定性，同等条件下可揭示出比 RFLP、RAPD、SSR 更多的多态性。因而，在解决复杂的基因组问题、遗传多样性的分子标记以及克隆研究等方面时，ISSR 技术常受到广泛关注。基于此，本研究运用 ISSR 标记对新疆贝母属植物进行亲缘关系系统分析，旨在为新疆贝母野生植物资源的收集、鉴定、保护和人工栽培育种等方面提供理论依据。

收稿日期： 2012-10-09
基金项目： 新疆维吾尔自治区自然科学青年基金项目（2010211B34）
作者简介： 王果平（1979—），女，助理研究员，主要从事资源植物与植物分类研究。Tel: 15299162356
***通信作者** 李晓瑾（1962—），女，研究员。E-mail: xjlxj@126.com

1 材料与仪器

采集新疆不同产地的 10 种贝母，见表 1。经新疆裕民县贝母试验站高级农艺师段咸珍鉴定。分别取其幼嫩叶片，硅胶干燥保存备用。

ISSR-PCR 扩增反应引物根据 British Columbia 大学公布的 ISSR 引物序列，由上海生工有限公司合成；Taq DNA 聚合酶、dNTPs、$MgCl_2$、10×Buffer 以及 1 kb DNA Marker 均购自上海生工有限公司。

BioER TC—96/G/H16 PCR 仪（杭州博日科技有限公司）；JUNYI—JY04S—3C 凝胶成像仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；Anke TGL—16C 离心机（上海安亭科学仪器厂）。

2 方法

2.1 贝母总 DNA 的提取和检测

采用改进的 CTAB 法提取基因组总 DNA，用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性和浓度，将其稀释为 100 ng/L 的工作液，置于−20 ℃冰箱中保存备用。

表 1 贝母属样品

Table 1 Samples in *Fritillaria* L.

序号	种名	采集地
1	新疆贝母 *Fritillaria walujewii*	吉木萨尔
2	伊贝母 *F. pallidiflora*	乌苏
3	裕民贝母 *F. yuminensis*	裕民
4	额敏贝母 *F. meleagroides*	额敏
5	塔城贝母 *F. tachengensis*	塔城
6	黄花贝母 *F. verticillata*	塔城
7	戈壁贝母 *F. karelinii*	塔城
8	大白花贝母 *F. verticillata* var. *albiflora*	塔城
9	小白花贝母 *F. verticillata* var. *albidoflora*	塔城
10	托里贝母 *F. tortifolia*	托里

2.2 扩增与成像

ISSR-PCR 最适反应体系（20 μL）：dNTP 为 0.3 mmol/L，Mg^{2+}为 2.0 mmol/L，模板浓度为 2～5 ng/μL，引物为 1.2 mmol/L，TaqDNA 聚合酶为 0.05 U/μL，其余用 ddH_2O 补充至 20 μL。扩增程序为：95 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s；52 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min 40 s，共 38 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min；4 ℃保存。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，用 1 kb DNA Marker 作相对分子质量标准，在紫外凝胶成像系统下拍照记录。

2.3 数据分析

ISSR 电泳结果采取 0/1 赋值记带，有带记为“1”，无带记为“0”。用 NTSYSpc V2.0 软件进行聚类分析。首先对原始矩阵用 simQual 程序计算种质间的 Nei-Li 相似系数，获得相似系数矩阵，相似性系数采用 Jaccard 系数。用 SHAN 程序中的非加权成组算术平均数法（unweighted pair-group method, arithmetic average, UPGMA）进行聚类分析。再用 TREEPLOT 过程生成聚类图。

3 结果与分析

3.1 扩增产物多态性分析

采集 10 种新疆贝母属植物对 100 条 ISSR 引物进行筛选，最终确定了 12 条带型清晰、多态性较好的 ISSR 引物用于贝母属多态性分析，引物序列及扩增结果见表 2。12 个引物扩增出的片段多集中在

表 2 ISSR 引物及其碱基序列和多态性分析

Table 2 ISSR primers, their sequences, and polymorphism analysis

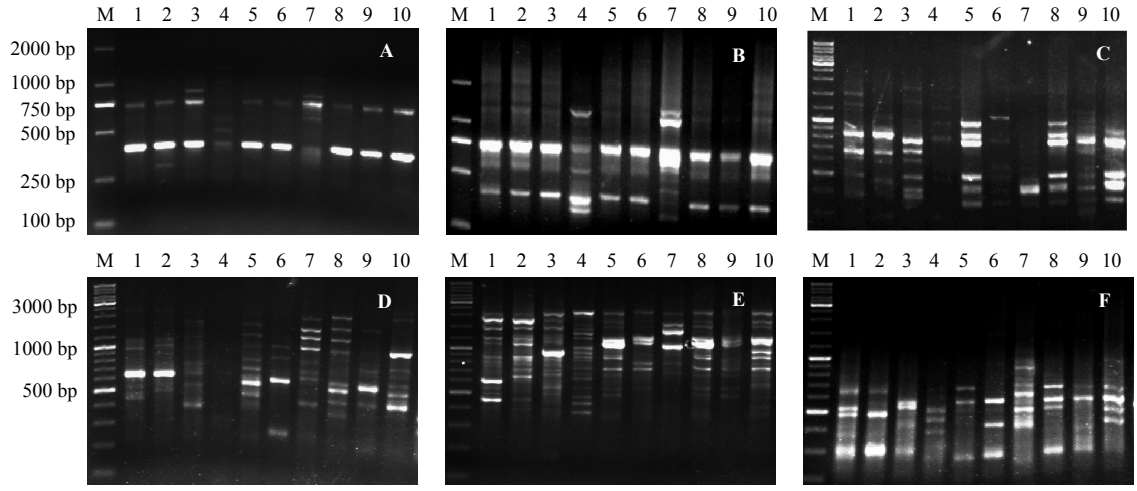
引物	引物序列	扩增条带	多态性条带	退火温度 / ℃	多态性位点比率 / %
UBC812	(GA)A	21	21	48.0	100.00
UBC815	(CT)G	19	19	50.0	100.00
UBC824	(TC)G	15	15	50.0	100.00
UBC830	(TG)G	12	12	50.0	100.00
UBC835	(AG)YC	19	19	50.7	100.00
UBC844	(CT)RC	15	15	50.7	100.00
UBC848	(CA)RG	13	12	50.7	92.86
UBC859	(TG)RC	17	17	50.7	100.00
UBC873	(GACA)	7	6	48.0	85.71
UBC876	(GATA) (GACA)	9	8	42.0	88.89
UBC878	(GGAT)	10	9	48.0	90.00
UBC895	AGAGTTGGTA	28	28	50.7	100.00

Y = (C, T), R = (A, G)

450～3 500 bp，共扩增出 185 个位点，其中有 181 个多态性位点，位点多态性比率为 97.84%；说明 10 种贝母遗传多样性较为丰富。引物平均扩增位点 15.4 个，多态性位点 15.1 个。其中引物 UBC812、UBC815、UBC824、UBC830、UBC835、UBC844、UBC859、UBC895 8 个引物的位点多态性比率都达到了 100%。部分引物扩增图谱见图 1。

3.2 贝母种质亲缘关系的聚类分析

相似系数矩阵图分析新疆 10 种贝母的种质间遗传相似系数，介于 0.37～0.80。其中新疆贝母与额敏贝母间相似系数最小，为 0.37；新疆贝母与伊犁贝母的相似系数最大，为 0.80；在 GS 为 0.50 处可以将 10 份材料分成 4 大类，见图 2。第 1 类有 3 个种，新疆贝母、伊贝母和裕民贝母；第 2 类有 5



M-DNA Marker 1～10-不同种类贝母 A～F 分别为引物 UBC 876、873、815、824、895、830 扩增结果

M-DNA Marker 1—10-different species in *Fritillaria* L. A—F-represent amplification results from Primers UBC 876, 873, 815, 824, 895, and 830

图 1 引物 ISSR 扩增结果

Fig. 1 ISSR amplification results of primers

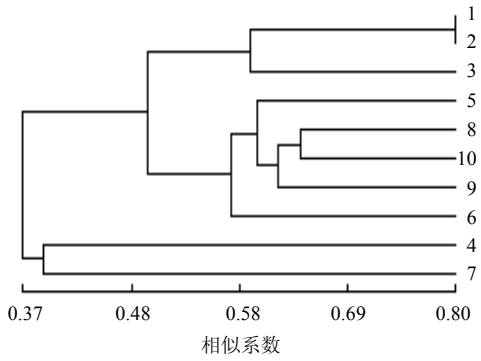


图 2 基于 Nei's 遗传距离的 ISSR 聚类分析图

Fig. 2 ISSR cluster analysis based on Nei's genetic distance

个种，分别为塔城贝母、大白花贝母、托里贝母、小白花贝母、黄花贝母；第 3、4 类均只有 1 个种，分别为戈壁贝母、额敏贝母。

4 讨论

本实验的供试材料经过适合的引物扩增，结果显示，DNA 多态性好，条带清晰，且聚类结果可以将所有材料区分开，证明 ISSR 标记可以用于新疆产贝母资源的遗传关系研究。从 ISSR 数据分析、聚类结果来看，选用的 12 条 ISSR 引物能很好地区分出新疆 10 种贝母，有效地揭示新疆贝母种质丰富的多态性和遗传多样性。在今后贝母的亲缘关系分析中，将 ISSR 标记技术与染色体核型、显微鉴别[11]及 DNA 条形码[12-13]等多种研究方法相结合，可为新疆贝母属植物鉴定和种质资源利用提供更加有力的理论依据。

目前，贝母属植物分类和命名多采用形态特征划分，如叶生情况、叶状苞片、花的形状如何等。如罗毅波等[14]提出大白花贝母、小白花贝母为黄花贝母的变种，并确定 *F. albidoflora* 等一系列变种名称，同时，支持这些变异为发生在栽培条件下花的变异，因此没有给予其分类名称。本实验结果显示，大白花贝母、小白花贝母、黄花贝母、托里贝母很好地聚在一起，说明黄花贝母与托里贝母亲缘关系较近，尽管它们的电泳图谱有所差别，这与吴晓青[15]的研究结果一致。而上述两种植物均分布在新疆的塔尔巴合台山和萨吾尔山，其地理分布重叠也间接

印证了本实验的结论。

新疆贝母、伊贝母和裕民贝母聚为一类，表明伊贝母与裕民贝母亲缘关系较近，这与吴晓青[15]和 Leon 等[16]的研究结果有一定差异，吴晓青[15]提出裕民贝母与小白花贝母及托里贝母亲缘关系较近，而 Leon 等[16]的研究显示：裕民贝母与黄花贝母关系最近，其次与伊贝母和托里贝母关系较近。造成这种差异的原因可能主要有以下几方面：（1）供试材料的选择不尽一致，吴晓青[15]和 Leon 等[16]均未选择新疆贝母进行比较；（2）本实验选择的伊贝母为栽培种，有可能在栽培的过程中发生基因的渗入；（3）供试贝母的采集地、采集时间有差异。

第 3 类为戈壁贝母，即戈壁贝母与其余贝母亲缘关系较远，并单独分支，这与前人的研究结果一致[17]。戈壁贝母生于平原蒿属荒漠中或砾石质低山丘上，其外部形态也与其他贝母有所区别。其他贝母生境较一致，为山地草甸带中及亚高山的灌木丛中。

实验结果显示额敏贝母与新疆贝母属其他植物遗传距离最大，亲缘关系最远，这与罗毅波[14]及段咸珍等[18]的研究结果有一定出入，更准确的关系有待进一步考证。新疆贝母属的绝大多数种类集中分布在塔城地区，以塔尔巴合台山及萨吾尔山为典型分布地带，成为新疆贝母属植物繁衍、分化的集中地。从实验结果也不难看出，这些植物亲缘关系较近，但谱带又不尽相同，分布地又存在一定的交叉现象，因此在进一步的研究中，种源鉴定的准确性是至关重要的。

参考文献

[1] 陈士林, 肖小河, 陈善塘. 松贝品质与土壤生态的相关性研究 [J]. 中药材, 1990, 6(3): 3-5.

[2] 李 萍, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 中药贝母类的研究 [J]. 药学学报, 1991, 26(6): 463-470.

[3] 余世春, 肖培根. 贝母属植物异旮体生物碱的存在及其分类学意义 [J]. 植物分类学报, 1992, 30(5): 450-459.

[4] 李 萍, 季 晖, 徐国钧, 等. 贝母类中药的镇咳祛痰作用研究 [J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(6): 360-362.

[5] 徐金中, 张红叶, 马喜彦, 等. 浙江主产区栽培浙贝母种质遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 109-113.

[6] 尹春萍, 刘文涛, 徐顺清, 等. 湖北贝母与川贝母随机扩增引物 DNA 的鉴别 [J]. 医药导报, 2007, 26(4): 359-361.

[7] 周 洁, 王忠华. 浙贝母遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 浙江农业科学, 2012(2): 156-159.

[8] Zhan S, Guo Q H, Li M H, *et al*. Disruption of an *N*-acetyltransferasegene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation [J]. *Development*, 2010, 137(23): 4083-4090.

[9] Dai F Y, Qiao L, Tong X L, *et al*. Mutations of an arylalkylamine-*N*-acetyltrans-ferase, Bm-iAANAT, are responsible for silkworm melanism mutant [J]. *J Bio Chem*, 2010, 285(25): 19553-19560.

[10] 任爱农, 秦民坚. 基于 RAPD 分子标记技术的中药材鉴定研究进展 [J]. 中南药学, 2008, 3(6): 338-341.

[11] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al*. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5: 8613.

[12] Chiou S J, Yen J H, Fang C L, *et al*. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 1421-1426.

[13] Song J Y, Yao H, Li Y, *et al*. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 434-439.

[14] 罗毅波, 陈心启. 新疆贝母属的订正 [J]. 植物分类学报, 1996, 34(1): 77-85.

[15] 吴晓青. 基于 ISSR 分子标记的观赏贝母亲缘关系分析 [D]. 南京: 南京林业大学, 2010.

[16] Leon C, Michael F F, Maryn R. Fritillaria yuminensis [J]. *Curtis*'s *Botanical Magazine*, 2009, 26(1/2): 21-32.

[17] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.

[18] 段咸珍, 郑秀菊. 新疆贝母属植物研究初报 [J]. 园艺学报, 1987(4): 12-16.