

6 种委陵菜属药用植物的 ISSR 分析

罗玥佳, 陈丹娜, 李妍, 龙昱, 粟敏, 陈琳, 王义军, 曾杰*

长沙医学院 基础医学系, 湖南 长沙 410219

摘要: 目的 研究委陵菜属 *Potentilla* L. 药用植物的亲缘关系。方法 对 6 份供试材料进行 ISSR 分析。利用 POPGENE 软件分析遗传相似系数, UPGMA 方法聚类, 构建亲缘关系系统图。结果 11 条引物共得到 105 条扩增条带, 其中有 89 条呈现多态性, 占 84.76%。遗传相似系数变化范围 0.447 6~0.790 5。结论 聚类结果显示, 来源于同一地区的委陵菜属药用植物种质聚在一起, 呈现出一定的地域性分布规律。从分子水平对委陵菜属药用植物的鉴定和开发提供遗传基础, 更好地指导种质资源的收集、评价。

关键词: 委陵菜属; ISSR; 基因多样性; 遗传相似系数; 亲缘关系

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2736-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.020

ISSR analysis of six medicinal plants in *Potentilla* L.

LUO Yue-ji, CHEN Dan-na, LI Yan, LONG Yu, SU Min, CHEN Lin, WANG Yi-jun, ZENG Jie

Department of Basic Medical Sciences, Changsha Medical University, Changsha 410219, China

Abstract: Objective To analyze the genetic relationship among the medicinal plants of *Potentilla* L. **Methods** Six species of germplasm resources in *Potentilla* L. were analyzed by ISSR molecular markers. To make up the systematic diagram of genetic relationship by Popgene 1.32 software, cluster by UPGMA method, and establish the dendrogram. **Results** A total of 105 ISSR bands were scored for 11 primers, among which 89 were polymorphic bands. The average percentage of polymorphic bands was 84.76%. Genetic similarity coefficient changed from 0.447 6 to 0.790 5. **Conclusion** By cluster analysis, it shows that some of the medicinal plants in *Potentilla* L. from the same region are in the same group and demonstrates the rule of geographical distribution in the tested materials. This study will provide the foundation for identification and development of medicinal plants in *Potentilla* L., and guide collection and evaluation of germplasm resources.

Key words: *Potentilla* L.; ISSR; genetic diversity; genetic similarity coefficient; genetic relationship

委陵菜属 *Potentilla* L. 药用植物广布北温带, 全球有 500 余种, 我国 86 种, 全国各省均有分布^[1], 在祖国传统医学中占有一定地位。根据有关资料^[2], 国产委陵菜属植物具药用植物的形态特征、性味、功能主治、采集制备及国内分布等都有一定的差异, 但很多地区将形态相似的委陵菜属药用植物替代混用, 影响了临床用药的安全有效性。由于委陵菜属药用植物在中医药中的特殊地位和作用, 对其来源进行鉴定研究也很有必要。近年来, 对各种委陵菜属药用植物的研究主要集中于化学成分、药理作用等方面, 而对于亲缘关系多态性的分析涉及较少。

简单重复序列区间 (inter simple sequence repeat,

ISSR) 是由 Zietkiewicz 等^[3]于 1994 年建立的基于微卫星系列的分子标记技术, 具有简便、不需预先知道序列信息、重复性强等特点, 广泛用于药用植物鉴定、近缘物种进化关系、中药质量标准化和辅助育种等。采用 ISSR 分子标记对 6 种委陵菜属药用植物进行了亲缘进化关系分析, 对委陵菜属药用植物的起源、分类及种属特征图谱的建立提供可借鉴的依据。

1 材料

1.1 材料与试剂

6 份供试材料均经湖南师范大学生命科学院刘克明教授鉴定, 见表 1。每个种均随机选取 5 株以上成熟植株, 取幼嫩叶片带回实验室, -80 °C 超低温

收稿日期: 2013-04-21

基金项目: 湖南省高等学校科学研究项目 (湘财教指 [2010] 75 号 10C0442)

作者简介: 罗玥佳 (1983—), 女, 讲师, 湖南株洲人, 研究方向为药用植物分子标记和成分的研究及基因克隆。

*通信作者 曾杰 179198310@qq.com

表1 委陵菜属药用植物种质来源及药用功能

Table 1 Sources and medicinal function of medicinal plants in *Potentilla* L.

序号	名称	拉丁名	来源	药用功能
1	朝天委陵菜	<i>P. supina</i>	湖南长沙	滋阴补肾、止血痢
2	委陵菜	<i>P. chinensis</i>	山东临沂	祛风湿、解毒
3	蛇含委陵菜	<i>P. kleiniana</i>	湖南浏阳大围山	清热解毒、止咳化痰
4	鹅绒委陵菜	<i>P. anserina</i>	四川九寨沟	健脾益胃、止渴生津
5	翻白草	<i>P. discolor</i>	湖南株洲	解毒、止血、消肿
6	大萼委陵菜	<i>P. conferta</i>	辽宁辽阳	清热、凉血、止血

温保存备用。室内实验在湖南大学生命科学与技术研究院植物分子生物学实验室进行。

T-GRADIENT PCR 仪: Biometra 公司; 纯水仪, 美国 Millipore 公司; 离心机, Eppendorf 公司产品; 凝胶成像系统, White/Ultraviolet Transilluminator 美国 UVP 公司; 765P 型紫外分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 水浴锅、光照培养箱、电泳仪等仪器均为国产。

1.2 试剂

dNTPs: Genview 公司产品; Taq DNA 聚合酶: MBI 公司产品; DNA Marker: 购于北京天为时代科技有限公司; 其他: 其他实验试剂为国产分析纯。所用引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司 2006 年公布的 ISSR 引物序列 (http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers_Oct2006.pdf), 由上海生工合成。

2 方法

2.1 ISSR-PCR 反应体系

在 T-GRADIENT 型 PCR 仪上扩增, 反应体系为 25 μ L, 包括优化后的 ddH₂O 14.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs 2.5 μ L (2 mmol/L), Mg²⁺ 2.5 μ L (25 mmol/L), 引物 1 μ L (10 mmol/L), DNA

模板 1 μ L (50 ng/ μ L), TaqDNA 聚合酶 1 U (0.4 U/ μ L), 所有操作均在冰上进行。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共循环 35 次, 然后 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

2.2 扩增产物的检测

将 PCR 产物在含有溴化乙锭 (EtBr) 染料染色的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结束后在凝胶成像系统中照相保存。

2.3 数据分析

同一引物、同一位点, 根据扩增产物的有 (1)、无 (0) 得到二元资料, 形成“0”、“1”矩阵。用 POPGENE 1.32 软件进行分析, 计算 Nei's 遗传距离, 使用 MEGA 3.1 软件根据遗传距离通过 UPMGA 法进行聚类分析, 构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 引物筛选

从 50 条加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 提供的 ISSR 引物序列进行筛选, 从中筛选出 11 条扩增条带清晰、多态性好, 重复性好的引物, 结果见表 2。

3.2 ISSR-PCR 扩增结果

用筛选出的 11 条引物对 6 份材料进行扩增, 共

表2 用于 ISSR 分析的 11 条引物及其扩增产物

Table 2 Sequences of 11 primers used in ISSR analysis and their amplification products

引物	序列	退火温度 / $^{\circ}$ C	总带数	多态性带数
UBC807	(AG) 8T	55	10	8
UBC816	(CA) 8T	55	6	6
UBC817	(CA) 8A	55	6	5
UBC821	(GT) 8T	55	11	11
UBC822	(TC) 8A	55	10	9
UBC823	(TC) 8C	56	9	7
UBC826	(AC) 8C	55	11	10
UBC827	(AC) 8G	55	7	6
UBC829	(TG) 8C	55	8	5
UBC834	(AG) 8GYT	56	15	12
UBC835	(AG) 8GYC	58	12	11

扩增出 105 条 DNA 条带，其中多态性 DNA 条带 89 条，占总条带数的 84.76%，每个引物扩增出的 DNA 条带数为 6~15 条，平均为 10 条（表 2）。这些 DNA 片段大小主要集中在 300~1 500 bp（图 1），以 300~1 200 bp 的扩增片段居多。扩增条带数最多的引物为 UBC834，达 15 条，扩增条带数最少的引物为 UBC816 和 UBC817，为 6 条。其中多态性百分比最高的引物为 UBC816、UBC821，达 100%，最低的为 UBC829，为 62.5%。以上表明 ISSR 能够揭示材料间的多态性，且经过标记谱带的分析，可鉴别 6 个供试品种，为指纹图谱的建立奠定基础。

3.3 聚类分析

从聚类图中可以看出，在距离线约 0.25 处，可将供试的 6 份材料分成 2 大类（图 2）。第 1 类包括 1、3、5 号共 3 份材料。1 和 5 号首先聚为一类，然后和 3 号聚为一类。第 2 类包括 2、4、

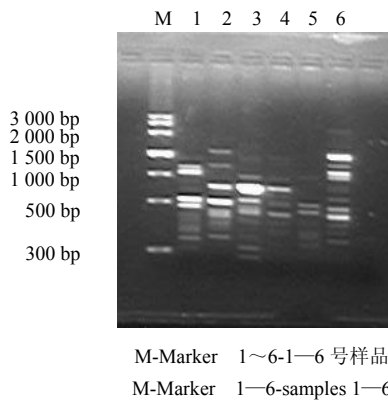


图 1 UBC835 引物对委陵菜属药用植物基因组的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 ISSR amplification results of medicinal plants in *Potentilla L.* by genome DNA with primer UBC835

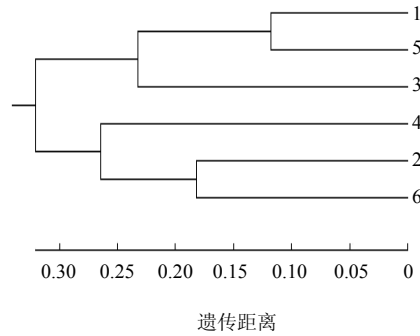


图 2 6 份委陵菜属药用植物基于 ISSR 遗传距离系数的聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of six medicinal plants in *Potentilla L.* based on ISSR genetic distances

6 号 3 份材料，其中 2 和 6 号聚成一小组，接着和 4 号聚在一起。根据遗传相似性，1 和 5 号的亲缘关系最近，遗传相似性为 0.790 5；1 和 4 号亲缘关系最远，遗传相似性为 0.447 6。6 份材料总的 Nei's 基因多样性指数为 0.351 3，Shannon 信息指数为 0.509 8。6 份材料的 Nei's 基因遗传距离在 0.265 1~0.803 8（表 3）。

4 讨论

对所收集材料中存在的遗传多样性进行评估是有效地利用和保护种质资源的关键环节，分子标记技术的发展将会对种质资源的评价起到极大的推动作用。ISSR 标记具有程序简单、操作快速、成本低等优点，因而已被广泛地应用于植物遗传多样性研究中。本研究利用 11 条引物对 6 份材料进行扩增，共扩增出 105 条 DNA 条带，其中多态性 DNA 条带 89 条，占总条带数的 84.76%，表现出较高的多态性，这种多态性将为委陵菜属药用植物种质资源的保存、鉴定、适应性评价以及生态型研究奠定可靠、稳定的基因基础。同时这种多态性也受地理距离的

表 3 6 份样品的遗传距离 (对角线下) 和遗传相似性 (对角线上)

Table 3 Genetic distances (below diagonal) and genetic identities (above diagonal) of six medicinal plants in *Potentilla L.*

样品	1	2	3	4	5	6
1	****	0.533 3	0.600 0	0.447 6	0.790 5	0.571 4
2	0.628 6	****	0.495 2	0.628 6	0.552 4	0.695 2
3	0.510 8	0.702 7	****	0.504 8	0.657 1	0.590 5
4	0.803 8	0.464 3	0.683 7	****	0.523 8	0.552 4
5	0.265 1	0.593 2	0.419 9	0.646 6	****	0.533 3
6	0.559 6	0.363 5	0.526 8	0.593 5	0.628 6	****

影响,从聚类分析来看,来自湖南地区的3个材料聚在一起,来自山东、四川、辽宁的3个材料聚为一类,表现出一定的地域分布规律。来源于同一地区的材料其遗传差异较小,亲缘关系较近,这是由于委陵菜属植物分布范围广泛,生境条件复杂,物种在长期适应环境的过程中会出现某些性状趋同的现象,造成不同物种性状间的交叉,因而对委陵菜属种及种下等级的划分,要综合考虑形态学、细胞学和分子生物学等方面的资料,才能更加有效地解释它们真实的系统关系。

由于供试的6种材料大部分根头部均有残留的叶基和茎基,并被白色绒毛或棉毛,临床上稍不注意,极易混淆。杨滨等^[4]对这6种药用植物地上部分的性状进行阐述和显微鉴定,从茎、叶非腺毛形状,茎腺毛形状,叶栅表比,下表皮气孔指数,主

脉外周细胞木化程度等方面,发现了一些比较重要的鉴别特征,为鉴别提供了参考依据。本实验经过ISSR-PCR扩增,产生许多多态性谱带,能基本将供试材料区分开来,特别是能区分经常混用的2和5号,为DNA指纹图谱的建立提供基础。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第三十七卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] 张勇, 李鹏, 李彩霞, 等. 委陵菜属药用植物[J]. 中兽医医药杂志, 2005(2): 59-63.
- [3] 余艳, 陈海山, 葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化和筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19.
- [4] 杨滨, 乐崇熙. 委陵菜属6种药用植物地上部分的性状和显微鉴定[J]. 中草药, 1994, 25(1): 32-34.