

西藏麻花艸种质资源的遗传多样性分析

倪梁红¹, 赵志礼^{1*}, 孟千万¹, 嘎 务², 米 玛²

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 对西藏不同产地 17 份麻花艸 *Gentiana straminea* 样品的遗传多样性进行比较分析。方法 居群采样, 以相同产地同属近缘种粗茎秦艸 *G. crassicaulis* 为外类群比对, nrDNA ITS 区序列分析, 构建 UPGMA 系统树。结果 西藏产麻花艸 nrDNA ITS 区序列有 1 个多态性位点; 外类群粗茎秦艸 6 份样品序列完全一致。结论 麻花艸与外类群种间区别明显; 17 份不同产地麻花艸被划分为 2 类, 遗传多样性较为丰富, 为西藏麻花艸药材品质评价及麻花艸核心种质的构建提供基础资料。

关键词: 麻花艸; 种质资源; nrDNA ITS 区; 遗传多样性; 藏药

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3212-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.021

Genetic diversity of germplasm resources of *Gentiana straminea* from Tibet of China

NI Liang-hong¹, ZHAO Zhi-li¹, MENG Qian-wan¹, GAAWE Dorje², MI Ma²

1. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa, 850000, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity of 17 samples of *Gentiana straminea* from different habitats of Tibet. **Methods** Sampling in populations was carried out, and the related species *G. crassicaulis* from the same area was as the out group; nr DNA ITS sequences were amplified and analyzed; UPGMA systematic tree was constructed. **Results** One polymorphic site of *G. straminea* from Tibet was found; the six samples of out group have the identical DNA ITS sequences. **Conclusion** The difference between *G. straminea* and the out group is obvious; seventeen samples of *G. straminea* from different habitats are divided into two groups; genetic diversity is more abundant; the result could provide the basic reference for the quality evaluation and the construction of core germplasm of *G. straminea* in Tibet.

Key words: *Gentiana straminea* Maxim.; germplasm resources; nrDNA ITS; genetic diversity; traditional Tibetan medicine

“解吉嘎保 (ཉུང་དཀར་པོ།)” 为常用藏药之一, 主治赤巴病; 其植物来源为龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 秦艸组 (Sect. *Cruciata*) 麻花艸 *Gentiana straminea* Maxim. 等数种植物^[1-2]。近年来, 本课题组开展了藏药解吉类的品种整理工作^[3]。在品种鉴定基础上, 进一步探讨藏药材产地与质量的相关性, 进行种质资源遗传多样性分析与物种的就地保护, 很有必要。

遗传多样性评价是种质资源评价中的重要内容之一^[4-5]。为此, 本实验以西藏麻花艸为研究对象, 在其主要产地那曲地区和昌都地区进行设点取样, 并以昌都地区丁青县相同产地同属近缘种粗茎秦艸 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 为外类群比对, 以植

物核糖体 DNA 序列中的内转录间隔区 (nrDNA ITS) 区为分子标记^[6], 评价该片段在西藏产麻花艸种下不同居群间的分辨率, 进而开展相关遗传多样性分析, 以期对西藏麻花艸药材品质评价及麻花艸核心种质的构建提供基础资料。

1 材料

样品均为实验室自采, 在西藏 2 个地区 3 个样点采集麻花艸 *Gentiana straminea* Maxim., 于其中一个产地采集近缘种粗茎秦艸 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 作为外类群, 所有标本经上海中医药大学赵志礼教授鉴定; 凭证标本存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室, 见表 1。

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173654)

作者简介: 倪梁红 (1980—), 男, 讲师, 主要从事中药资源与品种鉴定工作。E-mail: nlhtcm@126.com

表1 样品与凭证标本
Table 1 Samples and voucher specimens

名称	地理位置	海拔 /m	编号	凭证标本号	采集地
麻花苳 <i>G. straminea</i> (样点1)	N 31°55.634' E 94°01.957'	4 141	BQ1	XZ201213-1	西藏那曲地区巴青县城河边草滩
			BQ2	XZ201213-2	西藏那曲地区巴青县城河边草滩
			BQ3	XZ201213-3	西藏那曲地区巴青县城河边草滩
麻花苳 <i>G. straminea</i> (样点2)	N 31°23.178' E 95°49.844'	4 138	DQ1	XZ201215-1	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ2	XZ201215-2	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ3	XZ201215-3	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ4	XZ201215-4	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ5	XZ201215-5	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ6	XZ201215-6	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ7	XZ201215-7	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
麻花苳 <i>G. straminea</i> (样点3)	N 31°22.598' E 95°52.146'	4 225	DQ8	XZ201216-1	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ9	XZ201216-2	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ10	XZ201216-3	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ11	XZ201216-4	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ12	XZ201216-5	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ13	XZ201216-6	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
			DQ14	XZ201216-7	西藏昌都地区丁青县协堆村路边草地
粗茎秦苳 <i>G. crassicaulis</i> (外类群)	N 31°21.458' E 95°52.533'	4 561	CJ1	XZ201214-1	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地
			CJ2	XZ201214-2	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地
			CJ3	XZ201214-3	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地
			CJ4	XZ201214-4	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地
			CJ5	XZ201214-5	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地
			CJ6	XZ201214-6	西藏昌都地区丁青县协堆村山坡草地

2 方法

2.1 总DNA提取

采集各样本新鲜叶片, 硅胶快速干燥固定, 带回实验室后置-20℃冰箱。在CTAB法^[7]的基础上, 略做改进提取总DNA。

2.2 PCR扩增

利用nrDNA ITS区的通用扩增引物YP1和YP4进行该序列的扩增^[8]。引物序列如下: YP1为5'-GGAAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3', YP4为5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR反应在20 μL的反应体系中进行。反应液中含10×缓冲液2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.8 μL, 上游引物YP1 (10 μmol/L) 0.6 μL, 下游引物YP4 (10 μmol/L) 0.6 μL, dNTP Mix (各10 mmol/L) 0.5 μL, Taq DNA聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 模板DNA稀释20倍后加入2 μL, 加入去离子水补至20 μL。阴性对照加2 μL去离子水, 代替模板DNA。反应在(Eppendorf Mastercycler Pro S) PCR仪上进行, 循环参数为:

95℃预变性4 min, 95℃变性30 s, 59℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 共31个循环, 最后72℃延伸补齐10 min。

2.3 nrDNA ITS区序列测定

PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在700 bp处有清晰条带。产物送上海英骏生物技术有限公司纯化并测序(Axygen胶回收试剂盒纯化, ABI 3730xl型测序仪测序)。测序引物为YP1。

2.4 序列数据分析

ITS1和ITS2区的起止范围参考GenBank中龙胆属秦苳组的ITS区范围, 所得序列输入计算机后, 用MEGA5.0、MegAlign7.1.0 (44) 软件进行分析。

3 结果

3.1 各样本ITS区序列

巴青县3份麻花苳的ITS区全序列完全一致, 长度均为627 bp, 其中ITS1区为233 bp, 5.8 S区为164 bp, ITS2区为230 bp, 居群内样品间无位点差异; 丁青县2个居群14份麻花苳的ITS区全序列

完全一致，长度均为 627 bp，其中 ITS1 区为 233 bp，5.8 S 区为 164 bp，ITS2 区为 230 bp，居群内样品间无位点差异；丁青县 6 份粗茎秦艽的 ITS 区全序列的长度完全一致，长度均为 625 bp，其中 ITS1 区为 230 bp，5.8 S 区为 164 bp，ITS2 区为 231 bp，居群内样品间无位点差异。各样本的 ITS 区长度及碱基量见表 2。

表 2 ITS 区序列长度及 G+C 量
Table 2 Sequence length and G+C content

样品编号	T / %	C / %	A / %	G / %	G+C / %	ITS1 / bp	5.8 S / bp	ITS2 / bp	总长 / bp
BQ1—BQ3	17.54	29.67	22.97	29.82	59.49	233	164	230	627
DQ1—DQ14	17.70	29.51	22.97	29.82	59.33	233	164	230	627
CJ1—CJ6	17.76	29.92	22.72	29.60	59.52	230	164	231	625

麻花苳与外类群粗茎秦艽相比存在多个位点差异(巴青县样品、丁青县样品与之比较分别有 9 个、8 个位点差异)，可将 2 个物种进行有效区分。

将粗茎秦艽的 ITS 区序列作为外类群，构建 UPGMA 系统树。结果显示，外类群单独聚为一支；麻花苳被划分为 2 类：巴青县的样品与丁青县的样品各为一类，结果见图 2。

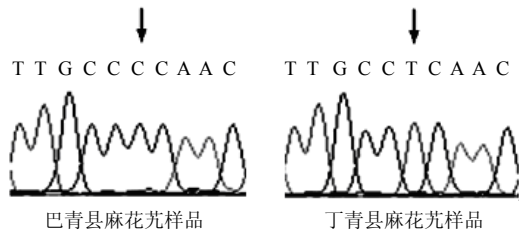


图 1 麻花苳 ITS 区多态性位点图

Fig. 1 Polymorphic site of *G. straminea* in ITS sequences

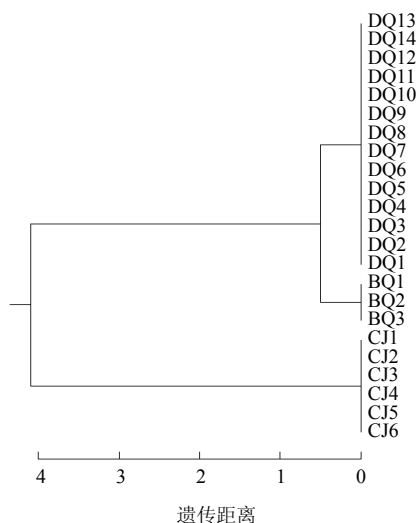


图 2 基于 ITS 序列构建的 UPGMA 系统发育树

Fig. 2 UPGMA systematic tree based on ITS sequences

3.2 麻花苳不同居群 ITS 区序列分析

所测定的 23 份样品的 ITS 区序列均无杂合位点出现。麻花苳巴青县的样品与丁青县的样品在 ITS 区的 537 位(位于 ITS2 区)存在多态性差异，巴青县样品该位点均为 C，丁青县样品该位点均为 T，其余位点皆一致(图 1)。

4 讨论

基于 nrDNA ITS 区序列构建的分子系统树，结果与形态分类学观点相一致：麻花苳种内丁青县 14 个样品聚为 1 支，巴青县 3 个样品聚为一支，这两支共同聚为一支；同时与粗茎秦艽种间并列为两大支。显示以 nrDNA ITS 区序列为分子标记，评价西藏麻花苳种质资源的遗传多样性是适宜的。相较于 ISSR、AFLP 等以条带显示实验结果的方法^[9-10]，nrDNA ITS 区序列测定法可获得具体多态性位点的信息。以此稳定的多态性位点设计相关引物，其产地鉴别意义不言而喻。

因居群分布、生长环境等多方面影响，不同产地的麻花苳在有效成分量及药材品质上可能存在差异。本实验初步确定了西藏产麻花苳的多态性鉴别位点，此位点与麻花苳药材的道地性、药材的品质是否相关，以及 nrDNA ITS 区序列是否适合藏药“解吉嘎保”其他品种的分析，尚待深入研究。

参考文献

- [1] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 杨永昌, 何廷农, 卢生莲, 等. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [3] Zhao Z L, Gaawe D, Wang Z T. Identification of medicinal plants used as Tibetan Traditional Medicine Jie-Ji [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 122-126.
- [4] Abdurakhmonov I Y, Abdurkarimov A. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources [J]. *Int J Plant Genomics*, 2008, ID574927: 1-18.
- [5] Rao V R, Hodgkin T. Genetic diversity and conservation

- and utilization of plant genetic resources [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2002, 68: 1-19.
- [6] China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that ITS should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108: 19641-19646.
- [7] Stewart C N Jr, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748-749.
- [8] Yuan Y M, Philippe K. Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianiae (Gentianaceae) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. *Plant Systems Evol*, 1995, 196: 207-226.
- [9] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, *et al*. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311-1320.
- [10] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.