

金线莲遗传多样性的 ISSR 分析

黄颖桢^{1,2}, 陈菁瑛^{1,2*}, 赵云青^{1,2}, 刘保财^{1,2}, 苏海兰¹

1. 福建省农业科学院 农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

2. 福建省农业科学院 药用植物研究中心, 福建 福州 350003

摘要: 目的 研究金线莲 *Anoectochilus roxburghii* 种质资源及其伪品的遗传多样性。方法 采用 ISSR 方法, 对 24 份试验材料进行 PCR 扩增, 对扩增结果进行电泳检测。对条带进行“0”、“1”矩阵标记后, 应用 NTSYSpc 软件, 计算材料间的遗传距离, 按照 UPGMA 法进行聚类分析, 构建聚类图。结果 采用 ISSR 技术可以鉴别出台湾金线莲、福建金线莲和公石松。地理分布和形态差异较大的福建金线莲具有相近的遗传关系。结论 金线莲野生种质资源间存在较丰富的遗传多样性, 为金线莲的品种选育带来巨大空间。

关键词: 金线莲; ISSR; 聚类分析; 遗传多样性; UPGMA 法; PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)15-2230-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.021

ISSR analysis on genetic diversity of *Anoectochilus roxburghii*

HUANG Ying-zhen^{1,2}, CHEN Jing-ying^{1,2}, ZHAO Yun-qing^{1,2}, LIU Bao-cai^{1,2}, SU Hai-lan¹

1. Institute of Agricultural Bioresource, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, China

2. Research Center for Medicinal Plant, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To study the germplasm resources of *Anoectochilus roxburghii*. and the genetic diversity of its spurious breed. **Methods** By ISSR-PCR amplification, 24 samples were PCR amplified, and then electrophoresis detected. After marking the electrophoresis strips with “0” and “1” matrix, the genetic distances were calculated by NTSYSpc software, and the dendrogram was constructed by UPGMA. **Results** *A. roxburghii*, *A. formosanus*, and *A. sp.* were identified. *A. roxburghii* with different geographical distribution and morphology had the close genetic relationship. **Conclusion** The wild population of *A. roxburghii* resources have higher genetic diversity, witch could provide a great genetic library for varieties breeding.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; ISSR; cluster analysis; genetic diversity; UPGMA method; PCR

金线莲又名金线兰, 为兰科开唇兰属 *Anoectochilus* Bl. 多年生草本植物, 是一种名贵珍稀中草药, 主要分布在我国南方的福建、台湾、浙江、云南、江西、广东和广西等省。金线莲以全草入药, 具有清热退火、凉血固肺、祛伤解毒、滋补强壮之功。闽台两省民间将金线莲广泛应用于治疗各种常见疾病及疑难杂症。台湾称之为“药王”和“药虎”, 福建省已将其列为省级野生药材保护品种。

福建省的金线莲人工栽培技术比较成熟, 金线莲产业正在不断扩大中, 已经成为福建省的特色中

药产业之一。福建省金线莲的主要人工栽培品种分别为来源于野生的金线兰 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl (俗称福建金线莲) 和台湾银线兰 *A. formosanus* Hayata (俗称台湾金线莲) 2 种。目前金线莲除了人工栽培以外, 市场上有相当一部分药来源于野生资源采挖, 其中往往混杂有来自云南等地的公石松, 在传统上这类品种往往被视作伪品。公石松的人工栽培成活率高, 生物产量明显较大, 经过干燥加工后, 普通消费者无法从外观上进行辨别。在对福建野生金线莲资源进行调查中发现, 在野生生境中,

收稿日期: 2014-01-16

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303117); 福建省种业创新与产业化工程资助项目(2011FJZY); 福建省属公益类科研院所专项资助项目(2011R1020-6)

作者简介: 黄颖桢(1976—), 男, 助理研究员, 研究方向为药用植物分子生物学、植物化学。

Tel/Fax: (0591)87596140 E-mail: hyzmpre@163.com

*通信作者 陈菁瑛 Tel: (0591)87596140 E-mail: cjj6601@163.com

有明显叶脉和无明显叶脉的金线莲有伴随生长的现象，而民间对其分别称为“莲母”和“莲公”，并将无明显叶脉的“莲公”视作伪品。所以目前金线莲的野生资源已近枯竭，种质资源遗传背景并不清楚，市场较为混乱。金线莲的分子标记技术的应用目前仅见胡珊梅等^[1-2]应用 RAPD 技术对福建、广西和台湾 3 份资源鉴别的报道，以及张福生等^[3]对金线莲 ISSR 反应体系的建立和优化。ISSR 分子标记技术因其重现性好和操作简便等优点，目前已经在水稻、小麦、玉米、马铃薯、葡萄^[4]、鱼腥草^[5]、麦冬^[6]、山药^[7]、泽泻^[8]、仙草、枸杞和石斛等主要农作物和中药材的遗传多样性研究中得到应用。本实验运用 ISSR 技术，对来自福建、广东和云南的野

生和栽培金线莲及其伪品进行遗传多样性研究，为品种标准制定和新品种选育改良提供理论依据。

1 材料

野生金线莲及其伪品种质资源采集自福建省、广东省和云南省，人工栽培品种收集自福建省漳州市金线莲企业。经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员和福建省农业科学院农业生物资源研究所陈菁瑛研究员鉴定，分别为金线兰 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl, 台湾银线兰 *A. Formosanus* Hayata 和公石松 *Anoectochilus* sp.。福建野生金线莲的采集地点的地表树冠层均为亚热带常绿阔叶林。24 份试验材料根据来源及形态可以初步分为 4 个类群，见表 1。

表 1 材料来源及描述

Table 1 Sources and description of materials

编号	来源地	描述	编号	来源地	描述
1	福建宁德	野生, 福建金线莲	13	云南景洪	野生, 公石松
2	福建漳州	野生, 无明显叶脉, 福建金线莲	14	云南景洪	野生, 福建金线莲
3	福建龙岩	野生, 福建金线莲	15	福建漳州	野生, 福建金线莲
4	福建龙岩	野生, 福建金线莲	16	福建漳州	人工栽培, 台湾银线兰
5	福建龙岩	野生, 福建金线莲	17	福建龙岩	野生, 福建金线莲
6	福建龙岩	野生, 无明显叶脉, 福建金线莲	18	福建龙岩	野生, 福建金线莲
7	福建龙岩	野生, 福建金线莲	19	福建三明	野生, 福建金线莲
8	福建龙岩	野生, 福建金线莲	20	福建三明	野生, 无明显叶脉, 福建金线莲
9	福建龙岩	野生, 福建金线莲	21	福建南平	野生, 福建金线莲
10	福建龙岩	野生, 福建金线莲	22	福建龙岩	野生, 福建金线莲
11	广东平远	野生, 福建金线莲	23	福建龙岩	野生, 无明显叶脉, 福建金线莲
12	广东平远	野生, 公石松	24	福建漳州	人工栽培, 福建金线莲

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取及检测

采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA。经过 Eppendorf Biophotometer 生物分光光度计检测 DNA 的纯度 (A_{260}/A_{280} 均在 1.7~1.9) 达到实验要求。用无菌超纯水调整 DNA 质量浓度为 20 ng/ μ L。

2.2 ISSR-PCR 扩增反应及产物检测

ISSR 引物由上海生工合成，序列来源于加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公开发布的 100 条 ISSR 引物。

PCR 反应体系建立参考张福生等^[3]研究结果，PCR 反应体系试剂购自 Takara 公司，PCR 反应总体积为 20 μ L，其中含模板 DNA 50 ng，0.3 μ mol/L 引物，

0.2 mmol/L dNTPs，1 U Taq DNA 聚合酶，2 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (Takara)，加入灭菌的超纯水至 20 μ L。

扩增程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，45~54 $^{\circ}$ C 退火 1 min (退火温度经梯度 PCR 筛选，不同引物的退火温度不同)；72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s，38 个循环；循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

ISSR-PCR 扩增产物检测：采用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳，缓冲液为 TAE，上样量 5 μ L，电压 100 V，时间 40 min，EB 染色 10 min，UVP 凝胶成像系统观察并拍照。

2.3 数据采集与统计分析

在电泳图谱上，选择清晰可辨的条带，同一迁移位置的有带 (包括弱带) 记为“1”，无带记为“0”，进行记录。用 NTSYS-PC 软件，建立按照 UPGMA

法进行聚类分析，构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 扩增结果

从 72 条引物当中筛选出 10 条多态性好、条带

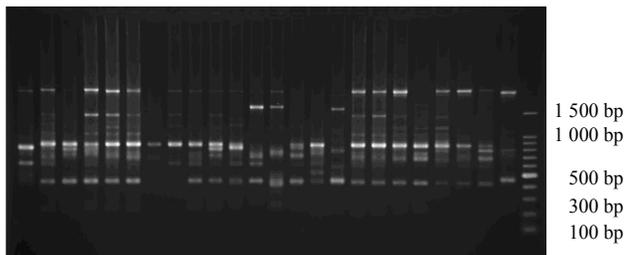
清晰且稳定的引物。引物扩增条带的多态率见表 2，其中引物 UBC860 的扩增图谱见图 1。10 条引物的多态率均较高，分别为 87.5%~100%；DNA 片段大多在 300~1 500 bp。

表 2 ISSR 引物及扩增产物水平

Table 2 ISSR primers and levels of amplified products

引物编号	序列 (5'-3')	退火温度 / °C	总条带数	多态性条带数	多态率 / %
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	54	16	16	100.0
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	16	14	87.5
UBC818	CACACACACACACACAG	53	17	17	100.0
UBC827	ACACACACACACACACG	53	24	24	100.0
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	48	17	16	94.1
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	53	21	21	100.0
UBC850	GTGTGTGTG GTGTGTYC	54	19	19	100.0
UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	54	15	15	100.0
UBC873	GACAGACAGACAGACA	52	18	16	88.9
UBC876	GATAGATAGACAGACA	45	9	8	88.9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 M



M-Marker 1~24-样品
M-Marker 1—24-samples

图 1 ISSR UBC860 的扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification of primer UBC860

3.2 聚类分析

通过数据分析，24 份材料聚类图见图 2，其遗传距离见表 3。24 份试验材料可以分成 6 类：其中台湾金线莲归为一类；来源于野生宁德的福建金线莲归为一类；漳州南靖人工栽培种归为一类；来源于广东和云南的公石松归为一类；其余来自福建、广东和云南各地的金线莲归为 2 类。

4 讨论

本实验应用 ISSR 分子标记技术，对 22 份金线莲与 2 份公石松资源进行遗传关系分析。结果表明，用 ISSR 技术可以鉴别出台湾金线莲、福建野生金线莲和公石松；其余野生金线莲种质资源的遗传差异与地理分布和形态的差异无关。

福建金线莲规模产业起步于 2008 年，据不完全

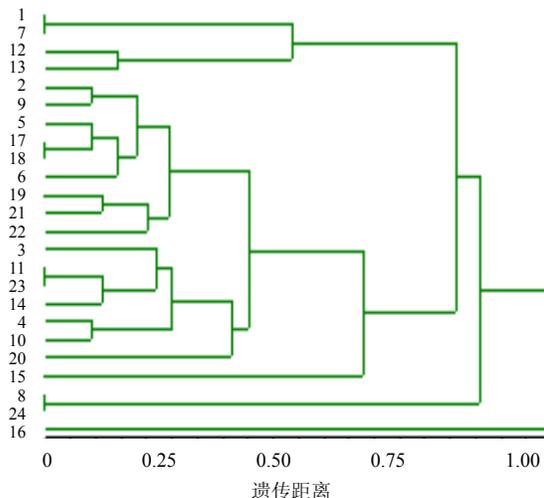


图 2 24 份材料的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 24 materials

统计，到 2012 年产值已超 10 亿元。福建省金线莲组培种苗来源于福建省内野生资源，具体地点已经无从考证。经过多年的人工选择培育，其已与目前野生资源呈现较大的遗传距离，说明目前的人工栽培种质资源已经出现一定的遗传分化。然而企业的技术力量有限，无法进行有效的金线莲组织培养的种质资源复壮和更新，目前生产中已经出现金线莲种质资源的变异和退化现象。所以对金线莲人工栽培种质资源的品种复壮和选育是目前金线莲产业的迫切需求。金线莲野生资源的遗传距离变化幅度较

表 3 24 份材料间的遗传距离
Table 3 Genetic distances among 24 materials

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	0.000 0																								
2	0.543 9	0.000 0																							
3	0.772 2	0.532 3	0.000 0																						
4	0.665 5	0.366 2	0.635 2	0.000 0																					
5	0.615 1	0.222 1	0.495 2	0.319 5	0.000 0																				
6	0.550 6	0.285 4	0.568 0	0.372 9	0.181 6	0.000 0																			
7	1.064 4	0.824 5	0.608 1	0.886 6	0.869 7	1.167 7	0.000 0																		
8	0.743 6	0.469 8	0.494 5	0.414 1	0.491 5	0.453 0	0.636 9	0.000 0																	
9	0.709 7	0.518 6	0.435 7	0.414 1	0.468 5	0.550 6	0.636 9	0.373 2	0.000 0																
10	0.602 4	0.470 2	0.374 4	0.506 5	0.538 4	0.547 5	0.523 5	0.420 1	0.286 6	0.000 0															
11	0.701 4	0.510 3	0.399 3	0.451 3	0.555 5	0.650 6	0.719 6	0.439 0	0.318 4	0.435 9	0.000 0														
12	0.789 8	0.598 7	0.633 6	0.584 7	0.589 9	0.578 0	0.856 8	0.589 2	0.589 2	0.549 0	0.580 9	0.000 0													
13	0.762 0	0.789 6	0.929 8	0.707 6	0.652 5	0.763 5	0.983 2	0.762 0	0.762 0	0.614 8	0.718 6	0.458 1	0.000 0												
14	0.812 2	0.544 1	0.414 7	0.557 5	0.535 3	0.579 0	0.648 1	0.475 7	0.367 5	0.414 4	0.385 2	0.638 5	0.795 5	0.000 0											
15	1.095 6	0.955 8	0.688 1	1.023 2	0.854 4	1.073 8	0.420 7	0.913 3	0.625 6	0.715 1	0.704 4	0.945 3	1.014 4	0.505 0	0.000 0										
16	0.827 6	1.004 2	1.075 5	1.199 9	1.049 4	0.930 9	1.262 3	1.089 9	1.041 1	0.954 5	1.187 0	1.015 9	0.890 9	1.233 3	1.139 4	0.000 0									
17	0.683 2	0.405 1	0.563 3	0.397 8	0.370 2	0.411 8	0.750 2	0.418 5	0.418 5	0.537 7	0.645 1	0.628 1	0.697 3	0.489 0	0.876 8	1.019 0	0.000 0								
18	0.798 4	0.429 6	0.716 3	0.442 9	0.364 8	0.390 9	0.983 2	0.538 9	0.538 9	0.675 4	0.684 7	0.773 2	0.745 3	0.613 2	1.079 0	1.235 8	0.174 0	0.000 0							
19	0.975 4	0.493 9	0.695 2	0.507 2	0.424 0	0.476 5	0.882 1	0.555 5	0.527 4	0.602 4	0.668 6	0.753 5	0.726 9	0.663 8	1.031 1	1.141 2	0.373 0	0.265 6	0.000 0						
20	0.905 1	0.581 8	0.785 3	0.595 2	0.571 5	0.617 5	1.063 1	0.673 3	0.639 4	0.591 0	0.700 1	0.796 5	0.805 0	0.825 3	1.168 5	1.182 2	0.471 8	0.413 0	0.327 0	0.000 0					
21	0.778 7	0.446 3	0.772 2	0.557 2	0.424 0	0.430 0	1.064 4	0.584 5	0.614 4	0.661 3	0.668 6	0.718 4	0.836 1	0.663 8	1.031 1	1.195 3	0.373 0	0.333 0	0.282 2	0.351 7	0.000 0				
22	0.875 3	0.501 9	0.883 3	0.566 5	0.498 3	0.483 9	1.047 7	0.567 8	0.660 2	0.739 9	0.718 6	0.701 7	0.745 3	0.647 1	1.014 4	1.235 8	0.425 3	0.339 9	0.333 0	0.527 4	0.333 0	0.000 0			
23	0.700 8	0.527 1	0.690 2	0.464 5	0.472 2	0.457 8	1.090 6	0.541 8	0.512 8	0.649 3	0.625 9	0.641 7	0.832 6	0.587 1	0.927 7	1.270 3	0.423 4	0.525 1	0.634 1	0.630 5	0.404 6	0.413 9	0.000 0		
24	0.717 2	0.736 8	0.820 5	0.827 1	0.819 7	0.820 5	1.295 0	1.045 7	0.940 3	0.804 9	0.983 3	1.020 4	1.086 2	0.860 5	1.143 9	1.345 9	0.869 4	1.211 3	1.163 4	1.226 7	0.940 3	1.086 2	0.897 5	0.000 0	

大,说明了金线莲野生种质资源间的遗传变异较大,为金线莲的品种选育带来巨大的遗传多样性空间。

本课题组在对福建野生金线莲资源进行调查中发现,在野生生境中,有明显叶脉和无明显叶脉的金线莲有伴随生长的现象,结合本中心的前期研究说明,有无明显叶脉的金线莲为同种植物,叶脉的是否明显是金线莲的性状分离现象。然而目前无明显叶脉的金线莲在应用上被视作伪品,其化学成分和药理活性研究为空白。高等植物的叶脉发育是由多个基因调控的,并且受植物体内外多种生理环境影响^[9-12]。目前模式植物拟南芥的叶脉发育机制已经得到较为深入的研究,一系列与叶脉发育相关的关键基因、生长素和小分子RNA 已经被揭示。研究无明显叶脉金线莲的化学

成分,同时揭示金线莲叶脉发育的分子调控过程与活性成分如黄酮和生物碱类等次生代谢产物的合成调控之间的联系,将是金线莲今后理论和应用研究的重点之一。

参考文献

[1] 胡珊梅,张启国,袁文杰,等. 珍稀中草药金线莲的 RAPD 研究 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 944-946.
 [2] 胡珊梅,张启国,周涵韬,等. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 949-950.
 [3] 张福生,郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 137-142.
 [4] 陈 龙,王家良,杨贤松. ISSR 分子标记及其在植物分子生物学中的应用 [J]. 种子, 2007, 26(10): 49-52.
 [5] 吴 卫,郑有良,陈 黎,等. 利用 ISSR 标记分析鱼

- 腥草种植资源的遗传多样性 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2003, 5(1): 70-77.
- [6] 叶桂英, 杨美全, 梁国鲁, 等. 两种常用麦冬栽培品种的 ISSR 分子鉴定 [J]. 亚太传统医药, 2007, 3(11): 48-50.
- [7] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 用 ISSR 标记技术分析山药品种遗传多样性 [J]. 实验生物学报, 2005, 38(4): 324-330.
- [8] 贺佳, 丁小余, 褚必海, 等. 泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(3): 86-90.
- [9] Robles P, Fleury D, Candela H, *et al.* The *RON1/FRY1/SAL1* gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1357-1372.
- [10] Carland F, Nelson T. *CVP2*- and *CVL1*-mediated phosphoinositide signaling as a regulator of the ARF GAP SFC/VAN3 in establishment of foliar vein patterns [J]. *Plant J*, 2009, 59(6): 895-907.
- [11] Gardiner J, Sherr I, Scarpella E. Expression of *DOF* genes identifies early stages of vascular development in *Arabidopsis* leaves [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(8/9): 1389-1396.
- [12] Scarpella E, Rueb S, Meijer A H. The *RADICLELESS1* gene is required for vascular pattern formation in rice [J]. *Development*, 2003, 130(4): 645-658.