

• 药材与资源 •

珠子参种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

王 薇^{1,2}, 刘 超¹, 崔九成^{1,2}, 宋小妹^{1,2*}, 梅其炳², 岳正刚²

1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046

2. 秦巴山区中药发展协同创新中心, 陕西 西安 710032

摘 要: 目的 研究珠子参 *Panax japonicus* 种质资源的遗传多样性。方法 采用 ISSR 分子标记技术, 通过聚类分析和主坐标分析, 研究 3 个主要产地珠子参的 19 个样本的遗传多样性和亲缘关系。结果 13 条 ISSR 引物扩增出 181 条带, 其中有 166 条呈现多态性, 占 91.71%, 遗传相似系数变化范围 0.60~0.83。聚类分析和主坐标分析结果一致, 将源于同一地区的珠子参样本聚在一起, 呈现出一定的地域性分布规律。结论 珠子参样本之间的遗传多样性水平较高, 种质间的亲缘关系和地理位置有一定关系。

关键词: 珠子参; ISSR; 聚类分析; 主坐标分析; 遗传多样性

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)17-2525-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.019

ISSR Genetic diversity analysis of *Panax japonicus* var. *major* by molecular makersWANG Wei^{1,2}, LIU Chao¹, CUI Jiu-cheng^{1,2}, SONG Xiao-mei^{1,2}, MEI Qi-bing², YUE Zheng-gang²

1. Shaanxi College of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine in Qinba Mountains, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of *Panax japonicus* var. *major* by inter simple sequence repeat (ISSR) molecular makers. **Methods** Genetic diversity of 19 samples from main production areas was investigated by ISSR and analyzed by principal coordinate analysis and UPGMA cluster analysis. **Results** A total of 181 bands were generated by 13 ISSR primers, among which 166 bands (91.71%) were polymorphic bands (PPB). The coefficient of genetic similarity ranged from 0.60 to 0.83. The results of UPGMA cluster analysis and principal coordinate analysis showed that the genetic diversity of *P. japonicus* var. *major* from the same region presented a geographical distribution regularity. **Conclusion** The results of ISSR analysis reveals that *P. japonicus* var. *major* has a high genetic diversity level and the genetic relationship closely contacts with the geographical location.

Key words: *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng; ISSR; cluster analysis; principal coordinate analysis; genetic diversity

珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 为五加科植物, 与同科植物羽叶三七 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的根茎作为传统中药^[1], 主要产自陕西、四川、云南等地。珠子参为竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. 的变种, 其药材商品还包括现代植物学上的狭叶竹节参 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *angustifolius* (Burk.) Cheng

et Chu、秀丽假人参 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *elegantior* (Burkill) Hoo et Tseng 等人参属近缘种的干燥根茎^[2], 其茎叶在主产地也作为“汉中参叶”或“七叶”药用或保健应用^[3]。由于其分布环境气候等因素不同, 导致这一类群植物形态和生药性状均有差异, 在植物分类学上一直存在争议^[4]。前期研究发现, 陕西产珠子参与云南产珠子参在药材性状、主要化学成分种类及含量上均有一定差异^[5-7],

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102805/H2804); 陕西省科技统筹创新工程项目(2011KTCQ03-02); 陕西省教育厅项目(2010JK502); 陕西省中医管理局专项科研计划项目(zzy08)

作者简介: 王 薇(1972—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中草药资源及质量控制研究。

Tel: (029)38185258 Fax: (029)38185165 E-mail: drnyw_19@126.com

*通信作者 宋小妹, 女, 博士, 教授, 硕士生导师。Tel: (029)38185165 E-mail: songxiaom@126.com

究其原因,除了与主产区的地域环境和气候因素有关外^[8],可能与珠子参的遗传变异也有一定相关性^[9]。然而,有关珠子参的遗传变异规律及遗传多样性方面的研究未见相关报道。

ISSR 分子标记技术现已广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究中,具有操作简单、稳定性好、检测方便、多态性高等优势^[10-11]。本实验采用 ISSR 对不同产区的珠子参的 19 份样本的种源遗传多样性进行研究,以期对珠子参药材的道地性研究、种

质资源鉴定和保护等提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试的 19 个样本分别采自陕西、四川、云南的 10 个不同地区,经陕西中医学院标本馆王继涛高级实验师鉴定,均为五加科植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng, 具体信息见表 1。野外采集新鲜叶片或根茎,用硅胶干燥, -80 ℃超低温冰箱保存,备用。

表 1 珠子参供试样本

Table 1 Materials used in test

序号	编号	类型	叶形	取样数	产地
1	TB-Y-1	野生	大叶	20	陕西太白县山神庙
2	TB-Y-2	野生	大叶	18	陕西太白县石沟
3	CC-Y-1	野生	大叶	15	陕西宝鸡市陈仓区方山坪
4	M-1	野生	大叶	15	陕西眉县汤峪镇
5	ZZ-Y-1	野生	大叶	11	陕西周至县厚畛子
6	Y-Y-1	野生	大叶	19	陕西洋县华阳镇
7	NQ-Y-1	野生	大叶	27	陕西兰州县舒家坝镇
8	EM-Y-1	野生	大叶	13	四川峨眉山市黄湾乡
9	EM-Y-4	野生	浅裂叶	11	四川峨眉山市黄湾乡
10	KB-G-1	野生	大叶	28	四川康定县雅拉乡
11	KB-G-2	野生	大叶	27	四川康定县贡嘎山
12	KB-G-3	野生	大叶	31	四川康定县榆林乡
13	YL-Y-1	野生	大叶	19	云南玉龙县拉美荣山北坡
14	YL-Y-2	野生	大叶	16	云南玉龙县拉美荣山南坡(1)
15	YL-Y-3	野生	大叶	18	云南玉龙县拉美荣山南坡(2)
16	YL-Y-4-1	家种	狭叶	27	云南玉龙县鲁甸镇
17	YL-Y-4-2	家种	大叶	27	云南玉龙县鲁甸镇
18	YL-Y-4-3a	家种	浅裂叶	25	云南玉龙县鲁甸镇
19	YL-Y-4-4a	家种	大叶	28	云南玉龙县鲁甸镇

所用 ISSR 引物参照加拿大的不列颠哥伦比亚大学所公布的序列,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试剂与仪器

10×PCR 缓冲液、MgCl₂、TaqDNA 聚合酶、dNTP Mixture、DNA ladder Marker CW0633、新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(nuclean plantgen DNA kit)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;DNA ladder Marker IV、V,购自北京天根生化科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠购自西安化学试剂

厂,均为分析纯。

CT 9612 型基因扩增仪(杭州柏恒科技有限公司);DYY—10C 型电泳仪(北京六一仪器厂);SM—76S 型凝胶成像系统(意大利 BIO-RAD Lab 公司);3—18K 型台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司)等。

2 方法

2.1 DNA 的提取及检测

取各样本约 1 g,采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,获得各供试品的 DNA 池。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。紫外分光光

度计测定其质量浓度和质量分数,统一稀释至 10 ng/ μ L,备用。

2.2 引物及其产物检测

对 ISSR 引物 UBC 进行筛选,从 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性明显的 13 条引物,用于 PCR 扩增。通过正交实验优化确定的 ISSR-PCR 扩增反应体系为 20 μ L,各反应成分分别为 PCR 缓冲液 10 $\times$ 2 μ L、模板 DNA 10 ng、dNTPs 0.25 mmol/L、引物 2 μ mol/L、TaqDNA 聚合酶 4 U、Mg²⁺ 2 mmol/L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;58 $^{\circ}$ C 退火 30 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;循环 40 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,置 4 $^{\circ}$ C 保存。反应产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色。结束后在 SM-76S 型凝胶成像系统观察并保存图像与记录。

2.3 数据采集与分析

以 0 或 1 对电泳谱带进行统计,建立二元数据矩阵,在相同迁移位置,有扩增带记为 1,无则记为 0。运用 NTSYS-pc V2.1 软件,计算遗传相似系数,UPGMA 进行聚类分析;将数据用 DCENTER 中心化后,采用 EIGEN 系统以图样柱坐标分析 19 个样本之间的相关性。

3 结果与分析

3.1 遗传多样性分析

从 100 条通用引物中筛选出 13 个重复性好、条

带清晰的引物对样本进行 ISSR-PCR 扩增,图 1 为扩增产物电泳图谱。对扩增产物结果进行多态性分析(表 2):19 个样本共扩增出 181 条 DNA 条带,片段大小在 400~1 100 bp;扩增出的条带中,多态性条带有 166 条,占总条带数的 91.71%;每个引物可扩增出 9~21 条条带,平均 13.9 条,DNA 片段的大小主要集中在 400~1 500 bp;各引物检测到的多态性条带比率为 75.00%~100.00%,13 个引物中 4 个引物的多态性条带比率为 100.00%,其中引物 UBC899 分辨率最高,扩增出 21 条多态性条带。

3.2 聚类分析

用 ISSR 标记形成的聚类图(图 2)。NTSYS-pc

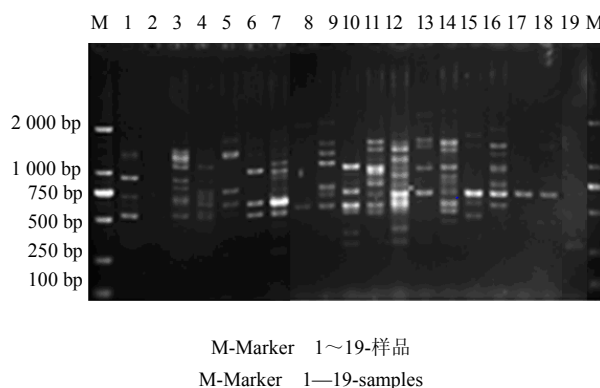


图 1 样本的 ISSR 引物 UBC899 扩增谱带

Fig. 1 Amplification profiles of samples by primer UBC899

表 2 ISSR 引物及扩增结果

Table 2 Amplification results of ISSR primers

引物	序列 (5'-3')	扩增条带总数	多态性条带数	多态性比率 / %
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	15	15	100.00
UBC818	CACACACACACACACAG	13	11	84.62
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	10	9	90.00
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	12	9	75.00
UBC847	CACACACACACACACARC	15	14	93.33
UBC855	ACACACACACACACACYT	12	10	83.33
UBC856	ACACACACACACACACTA	13	13	100.00
UBC857	ACACACACACACACACYG	11	11	100.00
UBC861	ACCACCACCACCACCACC	12	11	91.67
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	13	12	92.31
UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	18	16	88.89
UBC890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	16	14	87.50
UBC899	CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA	21	21	100.00
总计		181	166	91.71

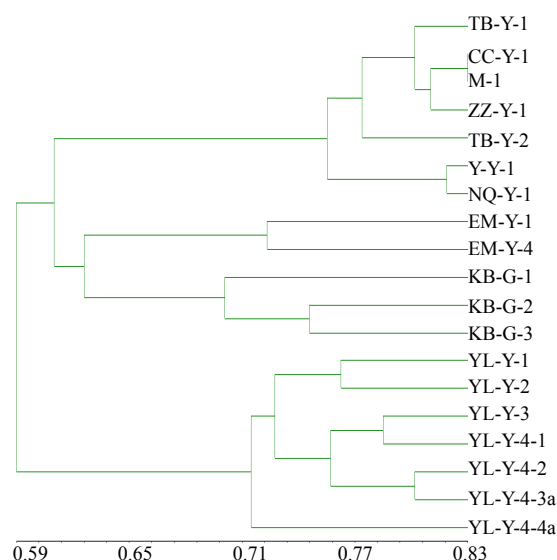


图2 样本的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of samples

V2.1 软件计算 19 个样本的遗传相似系数在 0.60~0.83, 遗传距离在 2.104 1~7.166 5。在遗传相似系数 0.61 处, 可将 19 个居群划分为 3 个类群, 陕西产者聚为 I 类, 且在 0.76 时秦岭北麓和秦岭南麓的样品分为 2 组; II 类产地均为四川, 且在 0.63 时按照产地峨眉和康定分为 2 组; III 类均为云南丽江所产。结果表明, 可把所有样本个体区分开来, 并且来自同一地区的样本有聚为一类的趋势。

3.3 主坐标分析

对 ISSR 标记的结果进行主坐标分析 (图 3)。可以看出, 其结果与聚类分析结果基本一致, 同样可以将 19 个样本按照产地的不同划分为 3 个类群, 前 3 个主坐标的方差贡献率为 46.1%。

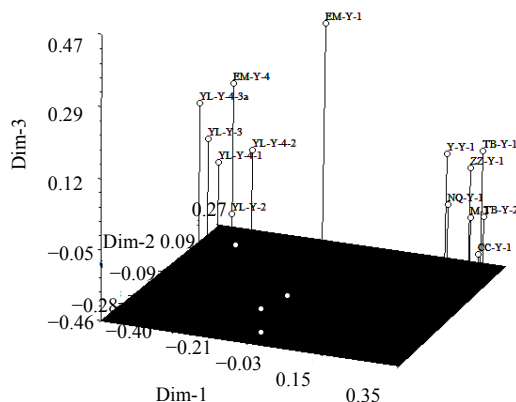


图3 主坐标分析的三维散点图

Fig. 3 3D plot of principal coordinates analysis

4 讨论

4.1 珠子参的遗传多样性

本实验利用筛选得到的 13 条 ISSR 引物对 19 个珠子参样本的遗传多样性进行评价, 珠子参的多态性条带比率为 91.71%。说明珠子参的遗传多样性丰富, 这些丰富的遗传变异对珠子参的野生驯化以及保持珠子参的生态适应性和种源不退化具有重要的意义。

在所研究的不同产地的种群中, 从遗传多样性参数来看, 3 个主产地采集的珠子参样品间遗传变异较为丰富。其中陕西产地各个参数值最小, 说明陕西产珠子参的遗传多样性较低, 四川和云南产地的样本量相比较; 云南产地的样本包括有野生品和栽培品。在所用的不同产地的样本中, 还存在着叶形变异情况, 所以对其遗传多样性的研究还需在接下来的工作中进一步深入探究。

4.2 珠子参的亲缘关系与地理分布

本研究通过对来自不同产地的珠子参进行了 ISSR 分析, 揭示了不同产地珠子参的遗传关系。从聚类分析的结果可以看出, 相近来源的样本聚在一起, 当相似系数在 0.59 时 19 个样本被聚为 2 类, 第 I 类中包含 1~7 共 7 个样本, 均产自陕西; 其中当相似系数在 0.76 时, 又以秦岭为界分为 2 小类; 产于宝鸡陈仓和眉县的 2 个相似度最高。第 II 类包括 8~12 共 5 个样本, 均产于四川。第 III 类均产自云南, 野生品和栽培品间有一定的差距, 在约 0.715 处 2 个野生品聚为一类, 其余的聚为另一类。

主坐标分析揭示了不同居群的遗传距离, 也验证了聚类分析对于不同产地珠子参的遗传差异的分析, 其结果与聚类分析结果基本一致, 按照产地的不同划分为 3 个类群。同时, 从三维图中的空间距离越近则亲缘关系密切这一点可以说明, 陕西产地珠子参与四川产地有更多的遗传相似性, 而与云南产地亲缘关系较远, 这一点也从地理分布上得到印证。

4.3 ISSR 分子标记在种质资源遗传多样性中的应用意义

ISSR 标记具有较好的稳定性和准确性, 适于珠子参种质资源的遗传多样性分析。聚类分析和主坐标分析结果能够将不同地域的居群分开, 有明显的地域相关性。珠子参种质资源采用 ISSR 标记划分的类群与地理分布及其种群有一定关系, 故此也说明 ISSR 分子标记技术可用于珠子参分布区域及种

群的鉴定,这也为 ISSR 技术用于其他药材的鉴别、遗传关系及道地性研究提供了参考。

我国珠子参资源的遗传多样性丰富,遗传变异较大。不同产区的珠子参具有明显的地域分布规律,相邻省份资源间遗传距离较小,亲缘关系较近。UPGMA 聚类结果和主坐标分析结果一致,均表明珠子参资源可按照地理位置不同划分为不同组群,其种质资源遗传多样性差异和遗传关系与其生长习性、生态分布及地理来源密切相关。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1978.
- [3] 李世全. 秦岭巴山天然药物志 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987.
- [4] 吴征镒, 冯国楣, 周俊. 人参属植物的三萜成分和分类系统、地理分布的关系 [J]. 植物分类学报, 1975, 3(2): 29-45.
- [5] 赵毅, 赵仁, 宋亮, 等. 珠子参药材品种概述及资源现状调查 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(1): 11-17.
- [6] 王薇, 李峰, 宋小妹. 不同产地珠子参生药鉴定研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1468-1469.
- [7] 宋小妹, 李林, 杨光明, 等. 不同产地珠子参中竹节参皂苷 IVa 含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 885-887.
- [8] 宋小妹, 杨新杰, 王薇, 等. 珠子参的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 59-61.
- [9] Choi H K, Wen J. A phylogenetic analysis of *Panax* (Araliaceae): integrating cpDNA restriction site and nuclear rDNA ITS sequence data [J]. *Plant Syst Evol*, 2000, 224(1/2): 109-120.
- [10] 邵青松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- [11] Tang L H, Xiao Y, Li L, et al. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 61: 132-140.