

• 药材与资源 •

内蒙古道地黄芪种质资源遗传多样性分析

姜丽丽¹, 郭九峰^{2*}, 张传领¹, 温建勋¹, 王秀娟¹, 牛丽丽¹

1. 内蒙古医科大学 自治区分子病理学重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010059

2. 内蒙古大学 自治区离子束生物工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要: 目的 建立黄芪 ISSR 分析最佳反应体系, 并分析内蒙古地区黄芪遗传多样性。方法 采用单因素梯度浓度实验和正交试验相结合的优化方法建立稳定、可靠的 ISSR 反应体系; 对内蒙古 9 个盟市 30 个不同居群的黄芪样本进行遗传多样性分析, 用 NTSYS2.1 软件进行数据统计。结果 ISSR-PCR 最佳反应体系 (20 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.0 μ L、MgCl₂ 1.5 mmol/L、dNTP 0.4 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1.5 U、模板 DNA 40 ng; 15 条 ISSR 引物共检测到 169 个扩增位点, 多态性位点 157 个, 多态位点百分率为 75%~100%, 遗传距离变幅范围 0.242 7~0.730 8, 聚类分析可知, 30 个居群黄芪样本可分为 2 大类, 大多数呈现地域分布规律。结论 建立的黄芪 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠; 内蒙古地区黄芪具有较高的遗传多样性, 种质间的亲缘关系与地理位置具有一定的关系。

关键词: 黄芪; 种质资源; 遗传多样性; ISSR 分析; ISSR-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)15-2279-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.018

Genetic diversity analysis of germplasm of authentic *Astragalus membranaceus* in Inner MongoliaJIANG Li-li¹, GUO Jiu-feng², ZHANG Chuan-ling¹, WEN Jian-xun¹, WANG Xiu-juan¹, NIU Li-li¹

1. Key Laboratory of Molecular Pathology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

2. Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: Objective To establish an optimum reaction system suitable for ISSR analysis of *Astragalus membranaceus* and to analyze the genetic diversity of wild populations in Inner Mongolia. **Methods** A stable and reliable ISSR reaction system was set up combining the concentration gradient of the single factor test and orthogonal test. The genetic diversity of 30 *A. membranaceus* populations in nine zones of Inner Mongolia was analyzed using NTSYS2.1 software. **Results** The optimal ISSR reaction system (20 μ L) contained 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μ L, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 1.5 U Taq DNA polymerase, 0.5 μ mol/L primer, and 40 ng template DNA. A total of 169 amplified loci were detected by 15 ISSR primers, in which 157 loci were polymorphic loci with the percentage of 75%~100%. The genetic distance amplitude ranged between 0.242 7—0.730 8. The clustering analysis showed that 30 *A. membranaceus* populations could be divided into two categories, and most of them corresponded to the geographical distribution. **Conclusion** ISSR-PCR reaction system for *A. membranaceus* is stable and reliable. Wild resources of *A. membranaceus* in Inner Mongolia have higher genetic diversity. The genetic relationship of the populations is correlated with its geographic location.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.; germplasm resource; genetic diversity; ISSR analysis; ISSR-PCR

黄芪 *Astragali Radix* 是一种传统中药材, 具有“补药之长”的美称, 黄芪品种繁多, 目前以《中国药典》2010 年版收载的黄芪为正品, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.

var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。春、秋二季采挖, 除去须根和根头, 晒干。具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌的功效^[1]。黄芪隶属于豆

收稿日期: 2015-03-13

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助项目 (2012MS0529)

作者简介: 姜丽丽 (1978—), 女, 硕士, 高级实验师, 主要从事药用植物分子生物学研究。Tel: (0471)6636297 E-mail: jianglili1978@126.com

*通信作者 郭九峰 Tel: 13739914583 E-mail: guojf101@sina.com

科, 黄芪属是一个多态性类群, 种类繁多, 变异较大, 全世界有 11 个亚属 2 500 多种, 主要分布于北半球的温带地区和南美洲, 中亚和西亚也有广泛分布^[2]。

内蒙古地区黄芪的栽培历史悠久, 清代吴其浚《植物名实图考》记载: 黄芪“有数种, 山西、蒙古产者佳。”由于黄芪主产于北方, 现代中医处方, 常常写为“北芪”。中药材的临床应用十分讲究道地。从本草考证可知, 黄芪的道地产区有由西南向东北迁移的趋势, 逐渐过渡至目前道地以山西、内蒙的蒙古黄芪为主的趋向, 开展道地药材的研究不仅能体现中医药特色, 而且是保证中医药持续发展的需要^[3], 目前由于黄芪栽培过程中存在种质混杂、退化等现象, 使黄芪产量和质量均有所下降, 严重影响了中药现代化、国际化的进程。因此需要积极开展黄芪种质资源的收集、保护和评价等基础研究工作。

ISSR 分子标记技术以其遗传多态性高、稳定可靠、不受环境因素影响等优点, 广泛应用于物种鉴定、遗传作图、基因定位、系统发育与进化等多个领域^[4]。本课题应用 ISSR 分子标记技术, 从稳定遗传的 DNA 分子水平上对内蒙古地区 9 个盟市不同来源的黄芪样本进行遗传多样性分析, 为促进黄芪生物多样性的保护及可持续性利用、发挥蒙古黄芪的道地性优势、推进规范化和产业化生产奠定基础。

1 材料与仪器

所用黄芪药材采自内蒙古 9 个盟市 30 个地区, 包括共计 80 个样本的野生种和栽培种(表 1), 经内蒙古医科大学张传领讲师鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 和膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。dNTP (2 mmol/L) (购自 invitrogen), 10×PCR 缓冲液、MgCl₂ (25 mmol/L)、Taq 酶 (5 U/μL) 均购自 Thermo Scientific, 引物根据加拿大哥伦比亚大学 (University of British Columbia, UBC) 公布的 ISSR 引物设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

实验主要仪器有 Sigma 高速冷冻离心机、ND 2000C 超微量分光光度计 (Thermo)、梯度基因扩增仪 (美国 AB 公司)、紫外凝胶成像分析系统 (基因有限公司)。

表 1 样品来源信息

Table 1 Information of sample sources

编号	样本数	生存状态	分类	来源
A1	5	野生	膜荚黄芪	呼伦贝尔
B1	4	栽培	蒙古黄芪	兴安盟
B2	2	栽培	膜荚黄芪	兴安盟
B3	4	栽培	蒙古黄芪	兴安盟
C1	5	栽培	蒙古黄芪	锡林郭勒盟
D1	7	栽培	蒙古黄芪	通辽
E1	2	栽培	膜荚黄芪	赤峰
E2	2	栽培	蒙古黄芪	赤峰
E3	2	栽培	膜荚黄芪	赤峰
E4	2	栽培	蒙古黄芪	赤峰
E5	2	栽培	蒙古黄芪	赤峰
E6	2	栽培	膜荚黄芪	赤峰
E7	2	栽培	膜荚黄芪	赤峰
E8	2	栽培	蒙古黄芪	赤峰
F1	4	栽培	蒙古黄芪	乌兰察布
F2	2	野生	蒙古黄芪	乌兰察布
F3	2	栽培	蒙古黄芪	乌兰察布
F4	2	栽培	蒙古黄芪	乌兰察布
G1	2	栽培	蒙古黄芪	包头
G2	2	栽培	蒙古黄芪	包头
G3	2	栽培	蒙古黄芪	包头
G4	2	栽培	蒙古黄芪	包头
G5	2	栽培	蒙古黄芪	包头
G6	2	栽培	蒙古黄芪	包头
H1	2	野生	膜荚黄芪	呼和浩特
H2	2	栽培	蒙古黄芪	呼和浩特
H3	2	栽培	膜荚黄芪	呼和浩特
H4	2	栽培	蒙古黄芪	呼和浩特
H5	2	栽培	膜荚黄芪	呼和浩特
I1	5	栽培	蒙古黄芪	鄂尔多斯

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

参考改进 CTAB 法^[5]提取黄芪总 DNA, 采用 2% CTAB 提取液, 其 100 mL 配方为: NaCl 8.19 g、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL、CTAB 2 g, EDTA 0.584 5 g。用 ND 2000C 超微量分光光度计进行 DNA 浓度和纯度的检测, 以 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 为纯度满意, 同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量, 最后将其稀释至 40 ng/μL, -20 °C 储存备用。

2.2 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

不同植物的 ISSR 反应体系中的各成分浓度、反应程序均不相同^[6-7], 因此建立精确的 ISSR-PCR 反应体系对保证 ISSR 实验结果的准确可靠非常重要。本研究利用单因素实验和正交试验相结合的方法, 首先对 DNA 模板、MgCl₂、引物、dNTPs、TaqDNA 聚合酶 5 个因素分别进行单因素浓度梯度实验, 由实验结果发现, DNA 浓度梯度对反应的影响并不大, 在 10~50 ng 均条带清楚, 而到 60 ng 时, 背景略深, 条带清晰度减弱, 本实验选择 40 ng 的 DNA 模板为黄芪 ISSR-PCR 反应体系的最佳用量。然后从其余 4 个因素中初步选出条带相对清晰的 3 个浓度 (水平) 进行后续正交试验, 反应体系见表 2。

表 2 正交试验反应体系

Table 2 Reaction system of orthogonal test

序号	MgCl ₂ / (mmol·L ⁻¹)	引物/ (μmol·L ⁻¹)	dNTPs/ (mmol·L ⁻¹)	TaqDNA 聚合 酶/U
1	1.5 (1)	0.3 (1)	0.25 (1)	1.0 (1)
2	1.5 (1)	0.4 (2)	0.30 (2)	1.2 (2)
3	1.5 (1)	0.5 (3)	0.40 (3)	1.5 (3)
4	2.0 (2)	0.3 (1)	0.30 (2)	1.5 (3)
5	2.0 (2)	0.4 (2)	0.40 (3)	1.0 (1)
6	2.0 (2)	0.5 (3)	0.25 (1)	1.2 (2)
7	2.5 (3)	0.3 (1)	0.40 (3)	1.2 (2)
8	2.5 (3)	0.4 (2)	0.25 (1)	1.5 (3)
9	2.5 (3)	0.5 (3)	0.30 (2)	1.0 (1)

从 UBC 公布的 96 条 ISSR 引物中选出 22 条引物对随机选取 2 个地区的黄芪 DNA 样本进行扩增预试验, 同时对每一个引物进行梯度退火实验, 确定最佳退火温度, 最终筛选出了 15 条条带数目相对较多、条带清晰且重复性好的引物进行后续的 ISSR 分析。

2.3 ISSR 扩增及产物检测

PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 45 s, 52 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 40 个循环后, 最后 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。

取 ISSR-PCR 扩增产物 5 μL, 在 0.5×TBE 缓

冲液中 2% 琼脂糖凝胶 100 V 电压电泳过中线, 以 DL2000 为 Marker, EB (0.5 μg/mL) 染色 15 min, 凝胶成像分析。

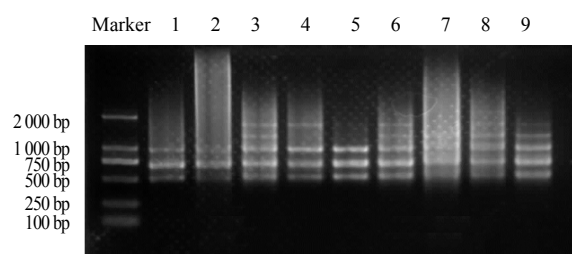
2.4 数据分析

ISSR 扩增图谱在相同迁移率位置上, 有带记为“1”, 无带记为“0”形成“0, 1”矩阵图输入 Excel 表格, 用 SLT_NTsyst2.10e 遗传多样性分析软件计算任意样品间的遗传距离, 构建聚类图。

3 结果

3.1 黄芪 ISSR-PCR 最佳反应体系建立

由正交试验 PCR 产物电泳结果 (图 1) 发现, 3 号组合反应体系条带数最多且最清晰, 最终确定最优 ISSR-PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2.0 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 引物 0.5 μmol/L, dNTP 0.4 mmol/L, Taq 酶 1.5 U, DNA 模板 40 ng, 总反应体积为 20 μL, 该反应体系产生的 ISSR 图谱清晰, 反应系统稳定, 适合黄芪样本的 ISSR 分析。



1~9-正交试验序号

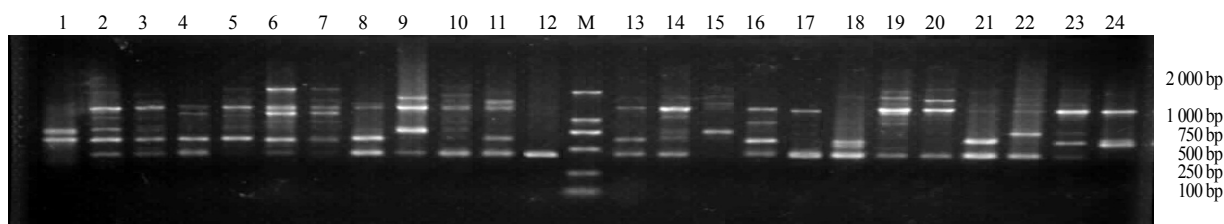
1—9-number of orthogonal test

图 1 ISSR-PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of ISSR-PCR

3.2 扩增产物的多态性分析

15 条 ISSR 引物共扩增出 169 条带, 其中 157 条表现出多态性, 占总带数的 92.9%, 平均每条引物扩增的 DNA 谱带数为 11 条, 变幅在 8~14, 扩增条带的相对分子质量从 100~2 000 bp 不等, 见图 2。多态位点百分率 (PPB) 在 75%~100% (表 3)。



1~24-随机选取的样本

1—24-random samples

图 2 引物 819 对部分黄芪样本扩增结果

Fig. 2 Amplification of primer 819 on some *A. membranaceus* samples

表 3 ISSR 引物最佳退火温度及多态性分析

Table 3 Optimum annealing temperature of ISSR primers and polymorphism analysis

引物	序列 (5'~3')	最佳退火温度/℃	扩增带数	多态性条带数	PPB/%
864	(ATG) ₅	46.6	13	12	92.31
880	(GGAGA) ₃	48.6	12	12	100.00
827	(AC) ₈ G	49.6	11	11	100.00
817	(CA) ₈ A	50.2	12	11	91.67
819	(GT) ₈ A	50.2	14	13	92.86
866	(CTC) ₅	50.3	12	10	83.33
834	(AG) ₈ YT	51.6	11	9	81.82
816	(GA) ₈ T	52.2	10	10	100.00
818	(CA) ₈ G	52.6	9	8	88.89
829	(TG) ₈ C	54.6	9	9	100.00
830	(TG) ₈ G	54.6	11	10	90.91
828	(TG) ₈ A	55.7	11	11	100.00
835	(AG) ₈ YC	56.3	13	12	92.31
862	(AGC) ₅	58.3	8	6	75.00
865	(CCG) ₅	68.0	13	12	92.31

3.3 不同地区遗传距离比较及聚类分析

基于 ISSR 扩增所产生的 169 条 DNA 带, 以 30 个采集地的黄芪样本为代表经遗传统计软件分析获得了遗传距离矩阵, 结果发现, 各地区栽培蒙古黄芪之间的遗传距离分布在 0.242 7~0.730 8, 变幅较大; 栽培膜荚黄芪之间的遗传距离分布在 0.353 8~0.603 8, 相对变幅要小一些。而来自同一地区乌兰察布市的野生蒙古黄芪 (F2) 与当地栽培种 (F1、F3、F4) 之间的遗传距离变幅为 0.338 3~0.423 7, 差异不大; 来自同一地区呼和浩特的野生 (H1) 和当地栽培种 (H2~H5) 之间的遗传距离变幅为 0.426 6~0.606 1, 差异相对明显。

对内蒙古 9 个盟市 30 个黄芪样本采集地的 ISSR 进行聚类分析, 得树状图 (图 3), 由图 3 可以看出, 所有材料在遗传系数为 0.60 处形成 2 大分支, 其中来源于乌兰察布市的黄芪 (F1~F4) 明显有别于其他各盟市, 并且与地域很近的呼和浩特野生种 H1 聚在了一支, 这一分支中共包含 2 个野生种 (F2 和 H1), 说明乌兰察布市的栽培品种与野生种亲缘关系很近。

在第 2 大分支中, 在遗传系数 0.62 处又明显地分为 3 类, 其中来自呼伦贝尔的野生种 (A1) 单独为一类; 兴安盟 (B)、锡盟 (C)、通辽 (D) 的黄芪聚在一起, 赤峰 (E)、包头 (G)、呼和浩特 (H) 的黄芪聚在一起, 除个别的样品外, 整体上呈现出从北到南按地域聚类的特点。

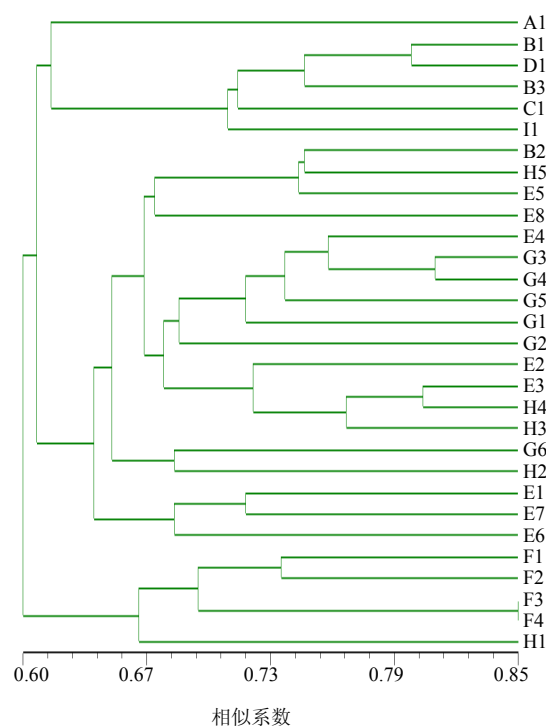


图 3 内蒙古地区不同居群黄芪 ISSR 标记聚类图

Fig. 3 Clustering dendrogram of ISSR of *A. membranaceus* from different populations in Inner Mongolia

通过聚类分析还发现, 样本中的栽培膜荚黄芪 (B2、H5、E3、H3、E1、E7、E6) 聚在了一大类中, 但比较分散, 此类中也包含蒙古黄芪, 这与张茹等^[8]研究的“不同产地、不同种的黄芪是先以产地聚类, 后以种来聚类, 表明蒙古黄芪虽为膜荚黄

芪变种,但是其遗传变异程度还未达到形成一个新的物种的程度”结论相一致。

4 讨论

DNA 分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段,它能够直接反映基因组 DNA 间的差异^[9],本实验应用的 ISSR 分子标记因其操作方便,经济实惠,不需要知道任何靶标序列的背景信息,且具有更高的遗传多态性和重现性^[10],该技术已被成功地应用于植物遗传多样性、DNA 指纹图谱绘制、分子生态学研究等众多领域。然而,ISSR 标记技术也有不足^[11],其不足之处在于 PCR 扩增反应的最适条件需要一定时间摸索,因此,本研究采用单因素实验和正交试验相结合的实验设计方法,对影响 ISSR-PCR 反应的多个因素进行了系列调整与优化,实验结果表明,ISSR 反应对 DNA 模板的用量不是特别的敏感,在 20 μL 的反应体系中 DNA 量在 10~50 ng 均可获得比较理想的实验结果;实验中发现 Taq 酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、引物浓度对 PCR 产率及多态性水平扩增都有着很大的影响;因此,要获得较稳定、清晰、可重复的条带,对 ISSR-PCR 反应体系的各种影响因子进行实验是完全必要的。同时,PCR 扩增程序中,退火温度能明显地影响 ISSR-PCR 扩增条带特异性,退火温度过低或过高都会导致特异性条带减少,因此本实验还对筛选出的 15 条引物逐个进行退火温度梯度实验,确定了每个引物的最佳退火温度。本实验 15 条 ISSR 引物扩增产物表现出的 PPB 在 75%~100%,显示黄芪药材基因多样性很丰富,其引物 880、827、816、829、828 的扩增 PPB 为 100%,可用于后期黄芪种质资源鉴定研究的一个参考。

内蒙古地区南北地域狭长,地理生态环境差异大,黄芪的遗传多样性丰富。本实验通过对内蒙古地区 9 个不同盟市黄芪样本间的遗传多样性分析发现,内蒙古黄芪的遗传距离变异幅度很大,地域相距不远栽培的膜荚黄芪、蒙古黄芪和野生黄芪之间遗传距离最大,亲缘关系最远,这可能与种质资源本身遗传差异及生存环境迥异有关,而来自同一盟市不同居群的黄芪样本遗传距离最小,亲缘关系最近,体现出栽培过程中生态环境对种质资源的影响,在栽培过程中,人工选择的结果使黄芪种质趋于更加接近。总体上内蒙古黄芪遗传距离的远近与地理位置生态环境具有一定的联系但不绝对,可能与药用植物本身对环境的适应能力和药用植物通过遗传

变异适应不同生境有关。

通过对内蒙古地区黄芪样本聚类分析发现,野生来源的黄芪 A1 明显区别于其他地区的栽培黄芪而单独聚为一类,但来自乌兰察布市不同采样地点的栽培种 F1、F3、F4 与野生种 F2 及呼和浩特野生种 H1 聚在了一大类中,体现出乌兰察布市该地区的黄芪栽培品种与野生黄芪资源遗传相似度高,亲缘关系更为接近,这可能与乌兰察布市黄芪栽培的地理环境与野生环境更为接近有关,如果后续实验能对该地区的栽培黄芪与野生黄芪药材主成分量上做进一步分析比较,将会对发掘内蒙古药性强的优势黄芪种质资源起到极大的促进作用。

黄芪是常用的中医临床用药,商品需求量大,长期受到掠夺性的开采,野生资源已近枯竭^[12],目前市场上的黄芪主要来源于人工栽培,内蒙的黄芪以其含粉质、糖分高、条杆粗壮、药性最强、品质最好畅销国内外,因此,对内蒙古黄芪种质资源进行遗传多样性分析和客观真实评价,为发挥内蒙古黄芪的道地性优势和深度挖掘内蒙古黄芪优良品种遗传潜力、保护当地黄芪种质资源具有重要意义。

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: 科学出版社, 1993.
- [3] 杨庆珍, 刘德旺, 王冬梅, 等. 黄芪生态型与品质的相关性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2395-2399.
- [4] 张安世, 刘莹, 赵利新. 均匀设计优化太行菊 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 生物技术, 2013, 23(6): 45-49.
- [5] 刘敏, 严萍, 詹若挺, 等. 黄芪干燥根 DNA 提取方法的研究 [J]. 药物生物技术, 2010, 17(5): 393-396.
- [6] 孙雅颖, 姚辉. 不同产地菘蓝 ISSR 分析与鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3323-3326.
- [7] 欧立军, 颜旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353-357.
- [8] 张茹. 药用黄芪 ISSR 遗传多样性分析 [D]. 太原: 山西农业大学, 2014.
- [9] 唐晓晶. DNA 分子标记在中药材鉴定中的应用研究 [D]. 北京: 中国中医科学院中药研究所, 2006.
- [10] Ye C J, Yu Z W, Kong F N, et al. R-ISSR as a new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2005, 23(2): 167-177.
- [11] 周延清. 简单重复序列间区标记技术 [M]. 北京: 化学工业出版社-现代生物技术与医药科技出版中心, 2005.
- [12] 张兰涛. 黄芪种质资源评价研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.