

• 药材与资源 •

野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析

王梦亮¹, 任晓琳^{1,2}, 崔晋龙^{1*}, 王俊宏¹

1. 山西大学应用化学研究所, 山西 太原 030006

2. 山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006

摘要: 目的 采用 RAPD 和 ISSR 分子标记进行野生红景天种间亲缘关系及种内的遗传多样性分析。方法 用 CTAB 法提取基因组 DNA, 然后通过筛选得到的 11 个 RAPD 及 11 个 ISSR 引物对不同采集地的 4 种野生红景天进行遗传多样性分析。结果 11 条 RAPD 引物共扩增出 96 条条带, 多态性百分比为 90.62%; 11 条 ISSR 引物共扩增出 102 条条带, 多态性百分比为 100%。ISSR 多态性的检测能力优于 RAPD; 聚类分析结果表明, ISSR 法、RAPD 和 ISSR 联用法均将 17 个样品聚为 3 大类; RAPD 将样品聚为 4 大类。结论 2 种标记均可用于红景天属植物种间亲缘关系与种内遗传多样性研究; 4 种红景天种内存在一定的遗传差异, 种间基因流较小。

关键词: 红景天属; RAPD; ISSR; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0469-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.020

Genetic diversity of wild plants in *Rhodiola* L. with two molecular marker methods of RAPD and ISSRWANG Meng-liang¹, REN Xiao-lin^{1,2}, CUI Jin-long¹, WANG Jun-hong¹

1. Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective The interspecific genetic relationships of the plants in *Rhodiola* L. were analyzed by RAPD and ISSR molecular markers. **Methods** The genomic DNA was extracted by CTAB method. Eleven RAPD primers and 11 ISSR primers were selected to analyze the genetic diversities of four kinds of wild plants in *Rhodiola* L., which were obtained from different regions of China. **Results** A total of 96 bands were amplified by 11 RAPD primers, and the percentage of polymorphism was 90.62%; And 102 bands were amplified by 11 ISSR primers, and the percentage of polymorphism was 100%. So the polymorphism detection ability of ISSR marker is higher than that of RAPD marker. Clustering analysis indicated that the samples were clustered into three categories by ISSR, RAPD + ISSR, and four categories by RAPD. **Conclusion** Both ISSR and RAPD markers are efficient methods at revealing in interspecific or intraspecific genetic differences and diversity of the plants in *Rhodiola* L.

Key words: *Rhodiola* L.; RAPD; ISSR; genetic diversity; cluster analysis

红景天是景天科 (Crassulaceae) 红景天属 *Rhodiola* L. 的多年生草本或灌木植物, 大多数生长在海拔 3 500~5 000 m 的高山流石或丛林下^[1]。红景天属植物在全球 96 种, 我国有 70 余种, 主要布于我国西南、东北、西北及华北等高寒山区^[2]。现代药理学研究表明, 红景天具有增强运动耐力、抗氧化、抗糖尿病、抗肺炎及哮喘、抗癌等生理

活性^[3-4], 被广泛应用于医药、保健品、化妆品等产业。由于其需求量越来越大, 野生资源面临巨大压力, 导致红景天属植物物种的生态破坏、遗传多样性正逐步丧失, 深入研究并获得这一濒危物种的遗传信息, 对于更好地深度开发和利用这一植物具有重要意义。

DNA 分子标记能够揭示物种核苷酸序列水平

收稿日期: 2015-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助 (31270383); 山西省自然科学基金 (2014011029-1); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20121401120001); 林业公益性行业科研专项 (201304326)

作者简介: 王梦亮 (1966—), 男, 博士, 研究方向为药用植物及活性产物资源开发。Tel: (0351)7016101 E-mail: mlwang@sxu.edu.cn

*通信作者 崔晋龙, 男, 博士, 副教授, 硕士, 主要从事珍稀药用植物及内生真菌资源开发研究。Tel: (0351)7016101 E-mail: CJL717@163.com

的遗传变异差异,具有可靠、精确、多态性高等诸多优势,在药用植物的鉴别、监管、多样性分析等中成为当前主要技术手段^[5],而 RAPD 和 ISSR 则是目前 2 种比较简便且可靠的研究方法^[6]。目前,对于红景天遗传多样性的分析主要只采用一种分子标记,将 2 种分子标记结合起来对红景天遗传多样性进行分析尚未见报道。本实验则采用 RAPD 和 ISSR 2 种分子标记对不同地区的长白红景天、大花红景天、柴胡红景天、库页红景天进行遗传多样性和亲缘关系分析,旨在为物种保护、改良、鉴定、

监管等工作提供数据基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

材料于 2012 年 5~9 月采自西藏、吉林长白山地区的不同地点,其详细的种名、编号、采集地见表 1,所有试验材料均由山西大学崔晋龙博士鉴定为长白红景天 *Rhodiola angusta* Nakai、大花红景天 *R. crenulata* (HK. f. et. Thoms) H. Ohba、柴胡红景天 *R. bupleuroides* (Wall. ex Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu、库页红景天 *R. sachalinensis* A. Bor。

表 1 供试材料的种名及采集地

Table 1 Species and habitats of investigated plants in *Rhodiola* L.

编号	种名	采集地	编号	种名	采集地
1	长白红景天	吉林安图县长白山	10	大花红景天	西藏墨竹工卡县差浦
2	库页红景天	吉林安图县长白山	11	大花红景天	西藏密拉
3	大花红景天	西藏墨竹工卡县财神湖北侧戈壁	12	大花红景天	西藏加兴乡
4	大花红景天	西藏墨竹工卡县财神湖东侧戈壁	13	大花红景天	西藏墨竹工卡县差浦
5	大花红景天	西藏米拉山口石碑北侧约 3 km	14	柴胡红景天	西藏墨竹工卡县财神湖北侧戈壁
6	大花红景天	西藏米拉山口石碑北侧约 5 km	15	柴胡红景天	西藏加兴乡
7	大花红景天	西藏米拉山口石碑南侧约 2 km	16	柴胡红景天	西藏米拉山口石碑南侧约 3 km
8	大花红景天	西藏达木嘎	17	柴胡红景天	西藏日多乡
9	大花红景天	西藏浦弄			

1.2 仪器与试剂

Eppendorf 5424R 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; BIO-RAD C1000TM Thermal Cycler PCR 扩增仪、BIO-RAD 164-5050 稳压稳流电泳仪、Gel DocTMXR⁺ With Image LabTM software,美国 Bio-rad 公司。

2 × EasyTaq PCR SuperMix、100 bp DNA Ladder,北京全式金生物技术有限公司; RAPD 随机引物、ISSR 引物,上海生工生物工程公司合成。

2 方法

2.1 DNA 的提取及检测

红景天总 DNA 的提取主要采用改良的 CTAB 法^[7],用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度及纯度,然后将样品 DNA 置于-20 °C 的冰箱中保存,备用。

2.2 引物的筛选

参考文献报道^[2,8],分别选取 RAPD、ISSR 引物各 12 条,用 1 个 DNA 样品进行 20 μL 体系的 PCR 扩增,分别对 12 条 RAPD、ISSR 引物进行筛选,选取条带清晰、扩增稳定的引物。

2.3 PCR 扩增及检测

2.3.1 RAPD-PCR 反应体系 2 × EasyTaq PCR SuperMix 7 μL (2 mmol/L Mg²⁺); 引物 2 μL (10

mmol/L); DNA 模板 2 μL; ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 37 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。

2.3.2 ISSR-PCR 反应体系 2 × EasyTaq PCR SuperMix 6 μL (2 mmol/L Mg²⁺); 引物 2 μL (10 mmol/L); DNA 模板 1 μL; ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 退火 1 min (退火温度根据各个引物的最适退火温度), 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。

2.3.3 电泳检测 将扩增后的 PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,上样量为 5 μL,电压 120 V,电泳 50 min,凝胶成像系统照相,保存。

2.4 数据统计及分析

对 17 份样品的电泳条带数进行统计,以 100 bp DNA Marker 为标准,根据在相同迁移位置有无扩增条带计数,将电泳图谱上清晰且稳定的条带赋值为“1”,无条带或弱带的赋值为“0”,形成 0/1 矩阵。用软件 POPGEN32 计算等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、基因多样性指数 (H)、Shannon 多样性指数 (I) 等;用 NTSYS-pc2.10e 软件采用

UPGMA 方法进行聚类分析, 构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 RAPD 扩增产物的多态性分析

根据引物筛选结果筛选出扩增条带清晰、重复性高的 RAPD 引物 11 条。11 条 RAPD 引物共扩增出 96 条条带, 多态性条带 87 条, 多态性百分比为 90.62%。每条引物平均扩增 8.73 条带, 由此可以看出不同的引物表现出不均匀的多样性, 其中引物

R7、R11 的扩增结果见图 1。

3.2 ISSR 扩增产物的多态性分析

根据引物筛选结果筛选出扩增条带清晰、重复性高的 ISSR 引物 11 条。11 条 ISSR 引物共扩增出 102 条条带, 多态性条带 102 条, 多态性百分比为 100%。每条引物平均扩增 9.23 条带, 其中引物 18 扩增的条带数最多为 12 条, 引物 17 扩增的条带数最少为 8 条, 引物 17、18 的扩增结果见图 2。

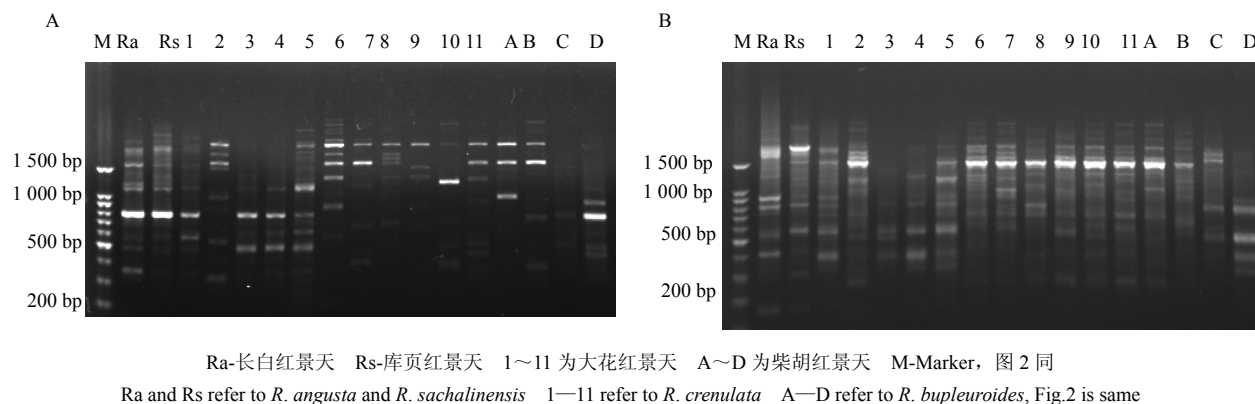


图 1 RAPD 引物 R7 (A) 和 R11 (B) 的扩增电泳图

Fig. 1 Amplification electrophorogram of RAPD Primers R7 (A) and R11 (B)

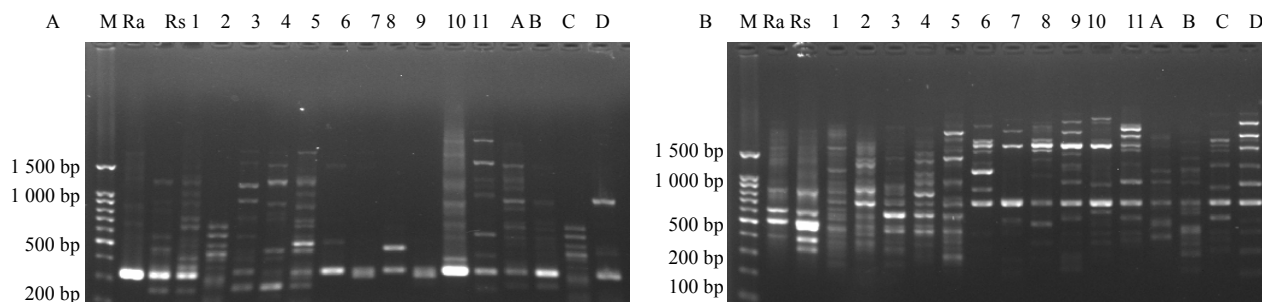


图 2 ISSR 引物 I7 (A) 和 I8 (B) 的扩增电泳图

Fig. 2 Amplification electrophorogram of ISSR Primers I7 (A) and I8 (B)

3.3 RAPD、ISSR 遗传多样性参数分析

基于 RAPD、ISSR 2 种分子标记得到的 0/1 矩阵, 通过 PopGene 32 软件, 假定 Hardy-Weinberg 平衡得到一系列的遗传多样性参数, 具体数据见表 2。结果显示, 采用 ISSR 分子标记得出的多态性条带百分比、 I 、 N_e 、 H 值均高于 RAPD 分子标记所得到的, 在一定程度上表明样品数相同、引物数相同时, ISSR 检测遗传多样性的能力较高。

同样采用 PopGene 32 软件也可以计算出 4 种野生红景天的总基因多样性 (H_t)、遗传分化系数 (G_{st})、种群内的基因多样性 (H_s)、种间基因流 (N_m), 结果见表 3。由表 3 可见, 采用 RAPD、ISSR 分析得到的 4 种野生红景天的遗传变异结果没有太大的区

别, 其 G_{st} 分别为 0.641 1、0.647 0, 即 4 种野生红景天的遗传变异约 64% 存在于种间, 36% 的遗传变异存在于种内, 由此可以得出 4 种野生红景天的遗传变异是以种间遗传变异为主。 N_m 在 0.272 7~0.279 9<1, 说明种间产生了明显的遗传分化。

3.4 聚类分析

3.4.1 单一分子标记的聚类分析 根据 RAPD 的扩增结果得出 0/1 矩阵, 经过 NTSYS2.10 软件计算得出 17 个红景天样品间的遗传相似系数范围为 0.458 3~0.906 3, 其中样品 5、6 的 G_{st} 值最大, 为 0.906 3, 说明这 2 个样品间的亲缘关系最近; 样品 1~11 的 G_{st} 值最小, 为 0.458 3, 说明这 2 个样品间的遗传距离最远。在平均值 0.625 0 处, 可将所有样品分为

表 2 RAPD、ISSR 分子标记分析 4 种野生红景天遗传多样性的结果比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison on genetic diversity of four wild plants in *Rhodiola* L. using RAPD and ISSR molecular markers ($\bar{x} \pm s$)

分子标记	多态性条带百分比/%	N_a	N_e	H	I
RAPD	90.62	$1.906 2 \pm 0.293 0$	$1.456 7 \pm 0.286 9$	$0.285 8 \pm 0.144 9$	$0.440 7 \pm 0.195 9$
ISSR	100.00	$2.000 0 \pm 0.000 0$	$1.456 8 \pm 0.274 0$	$0.290 4 \pm 0.126 0$	$0.455 1 \pm 0.153 1$

表 3 基于 RAPD、ISSR 分析 4 种野生红景天遗传变异

Table 3 Analysis on genetic variation for four kinds of wild plants in *Rhodiola* L. by RAPD and ISSR molecular markers

分子标记	H_t	H_s	G_{st}	N_m
RAPD	$0.293 7 \pm 0.033 3$	$0.105 4 \pm 0.004 0$	0.641 1	0.279 9
ISSR	$0.299 7 \pm 0.030 8$	$0.105 8 \pm 0.004 0$	0.647 0	0.272 7

4 大类, 见图 3-A。第 I 类包括长白红景天与库页红景天, 采集地均是吉林长白山; 第 II 大类是从米拉山口及财神湖采集的大花红景天; 第 III 大类包括 2 种红景天, 8~13 号样品为不同采集地的大花红景天, 15 号样品为采自加兴乡的柴胡红景天; 第 IV 大类均为柴胡红景天, 分别采自财神湖、米拉山口及日多乡。基于 ISSR 分子标记得到的 17 个红景天样

品间的遗传相似系数 (SM) 0.392 1~0.843 1, 平均值为 0.618 1, 其中样品 1~2 的 G_{st} 值最大, 为 0.843 0; 样品 1~4 的 G_{st} 值最小, 为 0.392 1。在遗传系数 0.578 0 处, 可将所有样品分为 3 类, 见图 3-B。第 I、II 大类的分类与 RAPD 的分类结果相同; 第 III 大类则包括大花红景天与柴胡红景天 2 种, 采自西藏的不同区域。

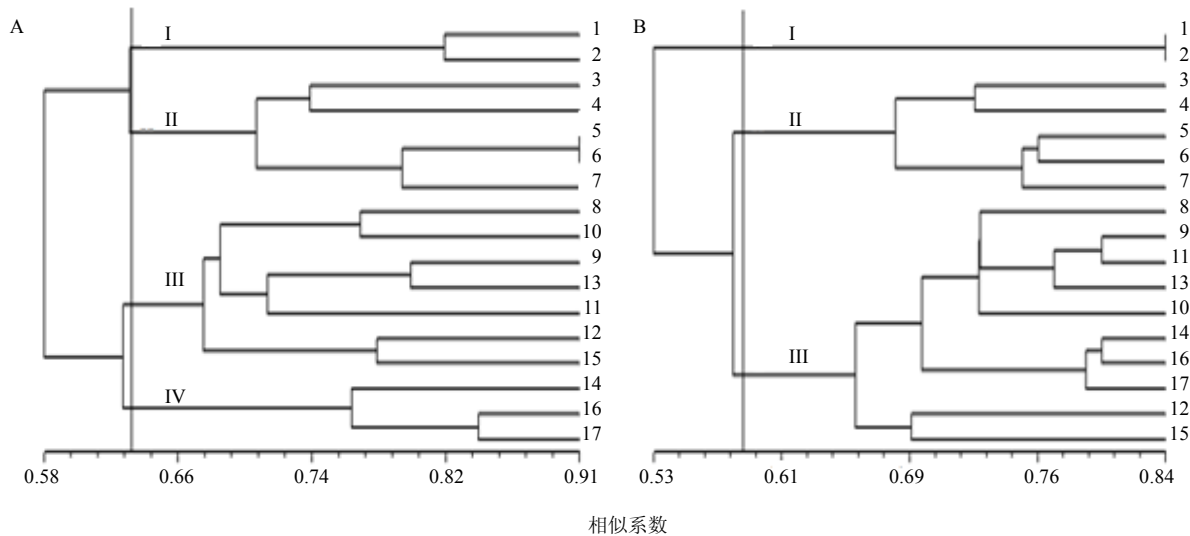


图 3 17 份红景天的 RAPD (A) 和 ISSR (B) 标记聚类图

Fig. 3 Dendrograms of cluster for 17 samples of *Rhodiola* L. based on RAPD (A) and ISSR (B) molecular markers

3.4.2 整合 RAPD、ISSR 对红景天样品的聚类分析
将 RAPD、ISSR 分析的 0/1 矩阵结合进行聚类分析构建聚类图, 样品间的 G_{st} 值在 0.484 8~0.833 3, 平均值 0.622 4, 以遗传系数 0.590 0 为阈值可将 17 份红景天样品分成 3 类, 见图 4。从图 4 可以看出, 将 2 种分子标记结合起来后的聚类结果与 ISSR 的聚类图非常相似, 均将所有样品分为 3 类, 且每大类中所包含的样品是相同的, 只是第 III 大类中各亚支所包含的样品不同。

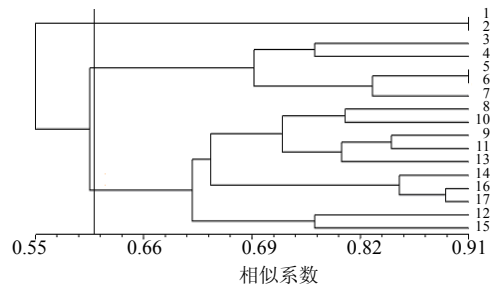


图 4 17 份红景天的 RAPD+ISSR 标记聚类图

Fig. 4 Dendrogram of cluster for 17 samples of *Rhodiola* L. based on RAPD + ISSR molecular markers

4 讨论

本研究分别采用 11 条 RAPD 引物和 ISSR 引物对不同地区的 17 份野生红景天进行遗传距离及遗传多样性的分析, RAPD、ISSR 2 种分子标记得到的多态性百分比分别为 90.62% 和 100%, 反映出供试的 4 个物种种间、种内存在较高的遗传多样性。每种分子标记技术都能从不同层次反映供试样品的遗传多样性, 但均存在一些局限性^[9], 故联合 2 种或多种标记则能更全面、客观地分析其遗传特征。RAPD 技术是以单一随机寡核苷酸序列为引物进行 PCR 非定点扩增, 特点是简单易操作, 但对反应条件敏感、重复性差, 且 RAPD 为显性遗传, 多态性信息量较低; 而 ISSR 是利用植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物, 对 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增, 标记引物较长、退火温度较高, 使其具有较强的可重复性, 比 RAPD 提供更多的遗传信息^[10]。因此, 在植物的遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育等研究中 ISSR 和 2 种方法联合应用较 RAPD 有更多的优势。从本研究结果来看, 在样品数比较小的情况下 3 种方式的聚类均能将不同种或不同来源的样品区分开, 结果相差不大, 但若以相同的遗传相似系数为阈值进行分类, 则 ISSR、ISSR+RAPD 的聚类更加全面。

3 种方式的聚类均能将不同种或不同来源的样品区分开, 从聚类结果看供试的 17 份红景天样品中, 显然 1~7 号及 12 号、15 号样品的聚类与其地理来源成一定的相关性。12 号大花红景天与 15 号柴胡红景天聚为一类, 反而与同种的其他采集地的红景天相聚较远, 原因可能是地理隔离削弱了两地之间植物种群基因交流, 从而导致种内出现了较为明显的分化^[11]。聚类结果表明长白红景天与库页红景天相近, 大花红景天与柴胡红景天相近, 而长白红景天、库页红景天与大花红景天、柴胡红景天亲缘关系较远。此聚类结果与根据植物体的叶形、根状茎等形态学分析相似, 但有所差异^[12]。根据形态学分类柴胡红景天、库页红景天与大花红景天相近, 而与长白红景天亲缘关系较远^[13]。形成差异的原因一方面可能是与其地理分布和来源有关, 另一方面可能与试验中同种材料的样本数有关。

对红景天的遗传多样性进行研究, 可以得到红

景天种间、种内的遗传变异和遗传分化的分子数据, 同时揭示不同地区的同种红景天及同种地区不同红景天间的亲缘关系与地理分布的相关性。红景天属植物生长环境复杂, 对环境变化敏感, 随着人们对红景天药用价值及化学成分的深入研究, 需求量也随之增大, 因此对红景天属植物多样性的研究对其物种的保护具有指导意义, 同时为红景天资源的合理利用及提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhao W, Zhao W T, Jiang Z, *et al.* Genetic diversity and its climate influencing factors of the endangered *Rhodiola sachalinensis* using molecular markers [J]. *Res J Biotechnol*, 2014, 9(7): 49-54.
- [2] 虞泓, 朱荣勋, 李永谊, 等. 云南常见药用红景天的 RAPD 分析 [J]. *中草药*, 2005, 36(1): 96-99.
- [3] Marina M K, Svetlana B G, Andrey A G. Analysis of the genetic structure of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms [J]. *Flora*, 2011, 206(8): 691-696.
- [4] Zsuzsanna G, Erling F, Márta L, *et al.* Genetic diversity of roseroot (*Rhodiola rosea*) in North-Norway [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 50: 361-367.
- [5] 王绍先, 王飞, 刘成柏, 等. DNA 分子标记技术在濒危物种保护中的应用 [J]. *生态学杂志*, 2008, 27(2): 250-256.
- [6] 阳翠, 刘萍, 刘姣蓉, 等. 苦豆子 ISSR 标记的遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(10): 1323-1327.
- [7] Zhu T T, Jin L, Du T, *et al.* Comparison of different methods for extraction of genomic DNA from *Ephedra intermedia* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 40(4): 316-318.
- [8] 雷一东. 大花红景天的 ISSR 遗传多样性与精油化学成分多样性研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [9] 齐琳洁, 龙平, 蒋超, 等. 黄芩基因组 SSR 分子标记的开发及遗传多样性分析 [J]. *药学报*, 2015, 50(4): 500-505.
- [10] 崔占虎, 龙平, 王颖莉, 等. DNA 分子标记技术在中成药鉴定中的应用与展望 [J]. *中药材*, 2015, 38(1): 190-194.
- [11] 王强, 阮晓, 李荷迪, 等. 珍稀药用资源植物红景天研究现状、问题与对策 [J]. *自然资源学报*, 2007, 22(6): 880-888.
- [12] 傅书遐. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 魏晓雨, 田义新, 赵智灵, 等. 不同产地西洋参种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3153-3158.