

• 药材与资源 •

新疆荒地阿魏遗传多样性的 ISSR 分析

阚萌萌¹, 王 恒¹, 康东建¹, 余风华¹ 谭 勇^{2*}, 朱 芸¹

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000

2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109

摘 要: 目的 研究新疆荒地阿魏 *Ferula syreitschikowii* 种质资源的亲缘关系及遗传多样性。方法 以 96 份新疆荒地阿魏种质资源为材料, 从 33 条 ISSR 引物中筛选出条带清晰、多态性好的引物 15 条, 进行 ISSR 分子标记分析。结果 共扩增获得 292 条完整、清晰的谱带, 其中多态性条带为 289 条, 多态位点比率为 99.01%, 表明新疆荒地阿魏种质资源多态性较高, 具有较高的遗传多样性。经相关统计软件计算结果分析, 平均有效等位基因数为 1.725 6, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.404 8, 平均 Shannon's 信息指数为 0.587 9, 遗传相似性系数为 0.500 0~0.828 7。UPGMA 聚类结果显示 96 份材料分为 2 个类群 13 个亚类, 能够将不同来源的种质资源区分开来。结论 从分子水平上揭示了新疆荒地阿魏地理分布与种质资源间的亲缘关系及较高的遗传多样性, 为荒地阿魏品种鉴定提供相关依据。

关键词: 荒地阿魏; ISSR; 遗传多样性; 亲缘关系; Shannon's 信息指数; 有效等位基因数

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2100-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.027

ISSR analysis on genetic diversity of *Ferula syreitschikowii* in Xinjiang provinceKAN Meng-meng¹, WANG Heng¹, KANG Dong-jian¹, YU Feng-hua¹, TAN Yong², ZHU Yun¹

1. Shihezi University of Pharmacy, Shihezi 832000, China

2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: **Objective** To study the genetic relationship and genetic diversity of *Ferula syreitschikowii* germplasm resources in Xinjiang province. **Methods** A total of 96 *F. syreitschikowii* germplasm resources of Xinjiang province were used as experimental materials. Fifteen primers selected from 33 ISSR primers could obtain high polymorphism and reproducibility bands for ISSR molecular marker analysis. **Results** Total by 292 DNA bands were amplified including 289 polymorphic bands, counting for 99.01%. Genetic similarity analysis showed *F. syreitschikowii* germplasm resources of Xinjiang province with high genetic diversity. Through the statistical software analysis, the average number of effective alleles was 1.725 6, the average Nei's genetic diversity index was 0.4048, the average Shannon's information index was 0.587 9, and the genetic similarity coefficients among tested clones ranged from 0.500 0 to 0.828 7. These 96 germplasm resources were divided into two groups and 13 subgroups by UPGMA analysis, which could distinguish the germplasm resources from different sources. **Conclusion** From the molecular level, it reveals the relationship between the geographical distribution of *F. syreitschikowii* and the germplasm resources and higher genetic diversity of germplasm resources, which provides basis for identification of *F. syreitschikowii* varieties.

Key words: *Ferula syreitschikowii* K. Pol.; ISSR; genetic diversity; genetic relationship; Shannon's information index; number of effective alleles

荒地阿魏 *Ferula syreitschikowii* K. Pol. 是伞形科阿魏属 *Ferula* L. 多年生草本植物, 主产于新疆地区^[1], 无葱蒜样臭味, 民间归类于香阿魏, 全草入药。其味辛、温, 具有治疗虫积、痞块、心腹冷痛、活血消瘀和兴奋神经的功效^[2], 是一类具有重

要药用价值的珍稀植物资源。市场上荒地阿魏的伪品、次品较多, 使其鉴定存在一定困难, 而种质资源又是影响药材产量和质量的一个关键因素。因此, 准确鉴别荒地阿魏药材成了当前亟待解决的问题。

ISSR (inter-simple sequence repeats) 作为一种

收稿日期: 2016-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460574); 石河子大学应用基础研究青年项目资助 (2015ZRKXYQ16)

作者简介: 阚萌萌 (1991—), 女, 学士, 新疆乌苏人, 在读硕士, 研究方向为药用植物资源。Tel: 18799295336 E-mail: 1375024679@qq.com

*通信作者 谭 勇 (1976—), 男, 博士, 重庆人, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物资源。E-mail: xjty321@163.com

新型便捷的分子标记方法,具有可操作性、可重复性、稳定性高的特点,广泛应用于植物的品种鉴定、种质资源分析及遗传多样性的研究^[3]。新疆阿魏属植物有 21 种,目前仅见关于新疆阿魏遗传多样性的研究^[2]。为此,本研究以新疆荒地阿魏嫩叶为材料,采用 ISSR 分子标记方法对来源于新疆地区的 96 份荒地阿魏种质资源的遗传多样性进行研究,旨在从分子水平上揭示新疆荒地阿魏地理分布与种质资源间的亲缘关系及较高的遗传多样性,为荒地阿魏品

种鉴定和资源保护利用提供相关依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

根据新疆荒地阿魏资源的分布情况,2015 年 4 月至 2016 年 6 月共采集新疆荒地阿魏嫩叶样品 96 份。植物样品经中国科学院新疆生态与地理研究所沈冠冕研究员鉴定为荒地阿魏 *Ferula syreitschikowii* K. Pol., 硅胶干燥处理后放 -40 ℃ 冰箱中保存备用。样品编号及来源见表 1。

表 1 材料来源及描述

Table 1 Sources and description of materials

群号	来源	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	编号	数量
1	新疆石河子市阿魏滩 (后山)	85°28'	43°31'	910	1~32	32
2	新疆石河子市阿魏滩 (前山)	85°28'	43°31'	580	33~64	32
3	新疆玛纳斯县红山	86°09'	44°26'	609	65~96	32

1.2 仪器

Sigma3-18K 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); ProFlex PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); DYCZ-30C 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad); DKZ-2 型电热恒温振荡水槽 (上海精宏有限公司)。

2 方法

2.1 DNA 的提取

选用植物 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取荒地阿魏基因组 DNA, 装入离心管中。提取的样品 DNA 测定其紫外吸收值以检测浓度和纯度, 再用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 的完整性, 于 -40 ℃ 冰箱内保存备用。

2.2 ISSR 分析

2.2.1 引物选取 从加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的 ISSR 引物和相关研究的文献报道^[4-8]中共选取引物 33 条, 由上海生工生物工程股份有限公司合成。经过筛选后, 选出 15 条扩增产物稳定, 条带清晰且重复性好的引物, 分别是 UBC808、UBC809、UBC810、UBC811、UBC812、UBC815、UBC825、UBC834、UBC835、UBC836、UBC840、UBC841、UBC842、UBC848、UBC855 (表 2)。

2.2.2 ISSR 反应体系与 PCR 扩增程序 ISSR-PCR 扩增体系 (15 μL): 2 μL DNA 模板 (50 ng/μL)、1 μL 引物、2 μL ddH₂O、10 μL 2×Taq PCR MasterMix (包含 0.1 U Taq NDA 聚合酶、500 μmol/L dNTPs、

表 2 ISSR 引物及退火温度

Table 2 ISSR primers and annealing temperature

序号	引物	序列 (5'→3')	退火温度/℃
1	UBC808	(AG) ₈ C	55.0
2	UBC809	(AG) ₈ G	56.5
3	UBC810	(GA) ₈ T	54.0
4	UBC811	(GA) ₈ C	55.0
5	UBC812	(GA) ₈ A	49.0
6	UBC815	(CT) ₈ G	52.0
7	UBC825	(AC) ₈ T	52.0
8	UBC834	(AG) ₈ YT	56.0
9	UBC835	(AG) ₈ YC	55.0
10	UBC836	(AG) ₈ YA	51.0
11	UBC840	(GA) ₈ YT	49.0
12	UBC841	(GA) ₈ YC	54.0
13	UBC842	(GA) ₈ YG	51.0
14	UBC848	(CA) ₈ GG	58.0
15	UBC855	(AC) ₈ YT	57.0

Y = (C, T)

20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂)。PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ (因引物不同而异) 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 循环结束后 72 ℃ 延伸 5 min, 最后 4 ℃ 保存。

2.2.3 PCR 扩增产物检测 取 5 μL PCR 扩增产物于 5% 聚丙烯酰胺凝胶上, 120 V 电压电泳 120 min, 银染后检测。

2.3 数据统计与分析

用 15 条筛选引物分别对不同荒地阿魏 DNA 样品进行 ISSR 分析, 采用人工读带的方法统计不同样品在扩增条带上的差异情况。以清晰可见的条带为标准, 对于同一引物的扩增产物, 在相同迁移位置上出现的条带记为 1 个位点, 并标记为 1, 没有 DNA 条带或模糊不清的记为 0, 得到全部样品的 ISSR 图谱的 0/1 数据矩阵, 采用 POPGENE 32 软件计算多态性条带百分比 (The percentage of polymorphic bands, PPB)、等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Nei's 遗传相似性系数和 Shannon's 信息指数 (I)。利用 NTSYS-PC 2.1 软件进行计算分析, 按照 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) 法对得到的遗传相似矩阵进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 扩增产物的多态性分析

由表 3 可知, 15 条 ISSR 引物对 96 份荒地阿魏样品 DNA 进行 PCR 扩增, 共得到 292 条清晰条带, 其中多态性条带 289 条, PPB 为 99.01%, 引物 UBC809 和 UBC834 的多态位点百分比最低, 均为 94.74%。15 条扩增引物的条带数为 14~23 条, 平均为 19.4 条。扩增片段长度范围集中在 100~2 000 bp, 也有少数特异位点在此范围之外。引物 UBC842 对荒地阿魏部分样品的扩增结果见图 1。

利用软件 POPGENE32 计算各个位点的 N_a 、 N_e 、 H 和 I 。结果表明供试荒地阿魏品种的平均 N_e 为 1.725 6, 平均 H 为 0.404 8, 平均 I 为 0.587 9, 结果表明荒地阿魏基因组 DNA 多态性较高。具体数据见表 3。

表 3 ISSR 引物的扩增结果

Table 3 Amplified results of ISSR primers

引物	扩增带数	多态性带数	PPB/%	N_a	N_e	H	I
U808	21	21	100.00	2.000 0	1.670 2	0.382 5	0.563 8
U809	19	18	94.74	1.947 4	1.725 5	0.399 2	0.575 8
U810	21	21	100.00	2.000 0	1.750 0	0.418 8	0.606 5
U811	18	18	100.00	2.000 0	1.780 6	0.430 2	0.619 3
U812	18	18	100.00	2.000 0	1.729 6	0.413 6	0.601 3
U815	16	16	100.00	2.000 0	1.716 7	0.406 2	0.592 3
U825	14	14	100.00	2.000 0	1.756 8	0.418 3	0.604 8
U834	19	18	94.74	1.947 4	1.713 0	0.392 5	0.566 7
U835	23	23	100.00	2.000 0	1.757 2	0.418 4	0.603 6
U836	17	17	100.00	2.000 0	1.718 0	0.405 1	0.591 4
U840	23	23	100.00	2.000 0	1.714 2	0.404 1	0.589 2
U841	23	22	95.65	1.956 5	1.705 9	0.386 2	0.559 4
U842	18	18	100.00	2.000 0	1.726 8	0.400 4	0.581 6
U848	22	22	100.00	2.000 0	1.671 2	0.384 8	0.567 2
U855	20	20	100.00	2.000 0	1.747 7	0.411 7	0.595 8
平均值			99.01	1.990 1	1.725 6	0.404 8	0.587 9
总计	292	289					

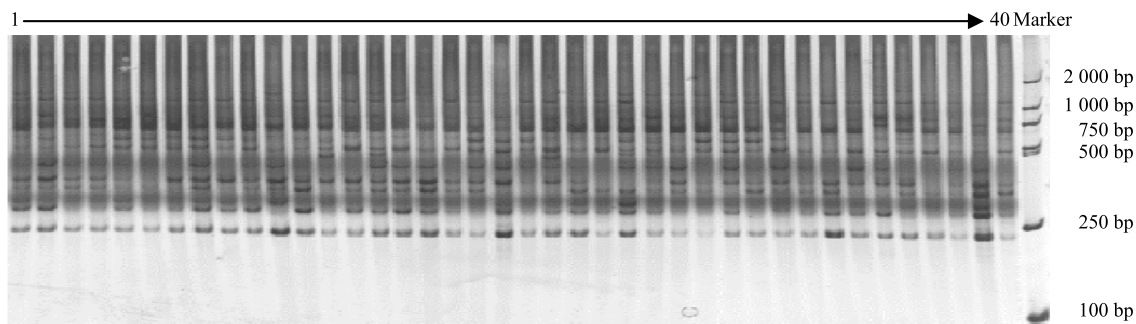


图 1 引物 UBC842 对 40 份荒地阿魏种质资源的扩增图谱

Fig. 1 ISSR amplification result of 40 *F. syretschikowii* samples with primer UBC842

3.2 遗传相似性系数与聚类分析

利用 NTSYS-PC 2.1 软件分析矩阵数据, 计算出 96 份荒地阿魏种质资源的遗传相似系数并对遗传距离进行分析。96 份荒地阿魏种间的遗传相似系数数值变化为 0.500 0~0.828 7。其中, 2 号群体中的 58 和 59 号荒地阿魏之间的遗传相似系数最大, 为 0.828 7, 遗传距离小, 表明它们之间亲缘关系较近。1 号群体的 4 号样品和 2 号群体的 57 号样品之间的遗传相似系数最小, 为 0.500 0, 表明它们之间的亲缘关系较远。结果表明这些样品间有相对较近的亲缘关系。这从分子水平上揭示了新疆荒地阿魏种质资源间亲缘关系及遗传多样性。

基于 ISSR 扩增结果, 采用 UPGMA 法构建了 96 份荒地阿魏种质资源的遗传关系树状图 (图 2)。当取遗传相关系数 0.580 为阈值时, 可将 96 份荒地阿魏样品聚为 2 个类群, 1 号群体 32 份样品和 2 号群体前 16 份样品共 48 份被聚为类群 I, 其余样品聚为类群 II。进一步取遗传相关系数 0.664 为阈值时, 则类群 I 可分为 9 个亚类群, 亚类群 Ia 只包括 1 号样品, 亚类群 Ib 包括 2~12 号共 11 份样品, 亚类群 Ic 包括 13~16 号共 4 份样品, 亚类群 Id 包括 17、19、21~24、26、27 号共 8 份样品, 亚类群 Ie 包括 28~34、36~43、45~47 号共 18 份样品, 亚类群 If 只包括 48 号样品, 亚类群 Ig 包括 18、20、25 号 3 份样品, 亚类群 Ih 只包括 44 号样品, 亚类群 Ii 只包括 35 号样品; 类群 II 可被分为 4 个亚类群, 亚类群 IIa 包括 49 和 50 号 2 份样品, 亚类群 IIb 只包括 68 号样品, 亚类群 IId 只包括 55 号样品, 其余的 44 份样品被聚为亚类群 IIc。

4 讨论

4.1 荒地阿魏的遗传多样性

ISSR (inter-simple sequence repeats) 分子标记技术^[9]具有多态性高、DNA 用量小、产物特异性强、安全性较高的优点^[10-11], 已被广泛应用于植物种质资源鉴定、亲缘关系和遗传多样性研究中^[12-15]。本研究对荒地阿魏 ISSR-PCR 扩增的反应体系进行研究, 结果表明, 供试的 96 份荒地阿魏种质资源的 PPB 为 99.01%, 高于徐海燕等^[2]的研究中新疆阿魏的 PPB 为 97.22%; 与伞形科其他属植物相比, 高于朱田田等^[4]的研究中甘肃当归的多态位点百分比 77.27%和赵香妍等^[8]的研究中北京野生柴胡的多态位点百分比 87.1%, 说明 ISSR 分子标记在荒地阿魏种质资源上表现出了较高的遗传多样性且种间遗传

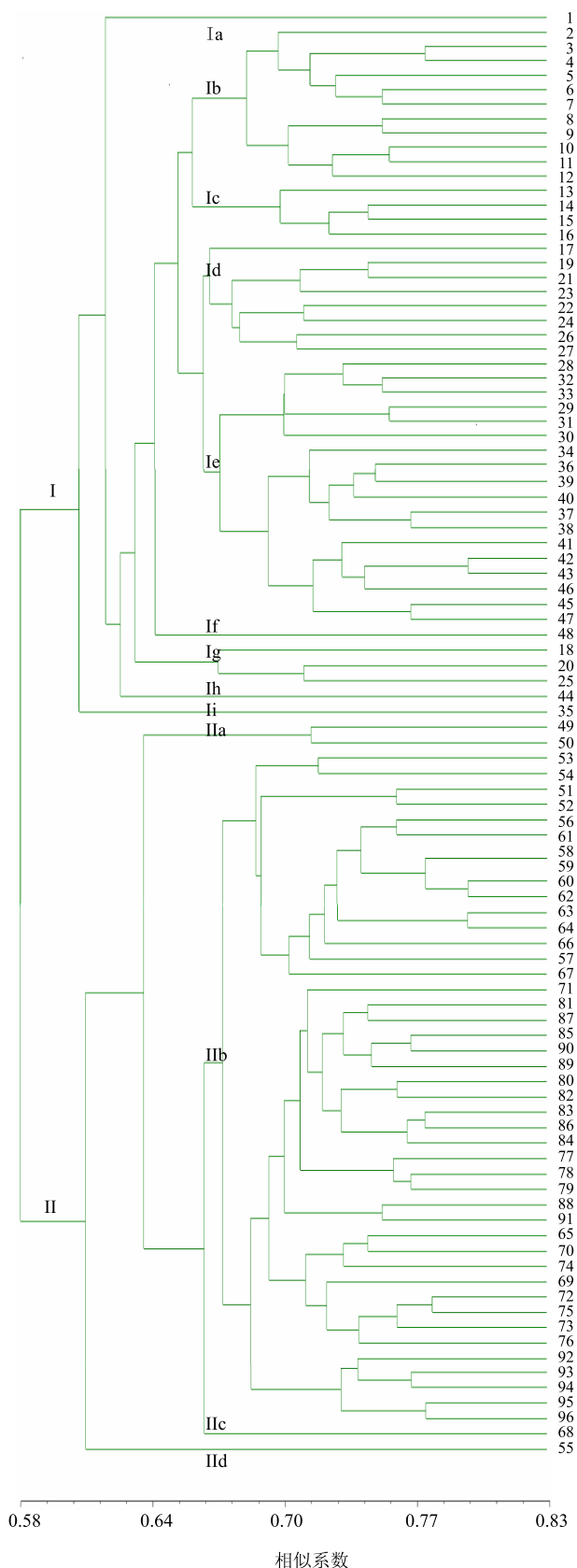


图 2 荒地阿魏种质资源的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA clustering map of *F. syreitschikowii* germplasm resources

相似系数变幅较大。物种的遗传多样性往往与物种本身的一些特性相关,例如生活史的长短、地理分布范围的大小以及遗传交换等都有可能直接或间接地影响物种整体遗传变异水平的高低^[16]。荒地阿魏为多年生一次开花结果植物,本研究结果表现出较高的遗传多样性,推测与其广域分布及不同品种在同域生长分布引起的种间杂交等因素有关。

4.2 荒地阿魏亲缘关系

根据遗传距离对 96 份荒地阿魏种质资源进行 UPGMA 聚类,结果表明,相同来源的荒地阿魏大部分被聚为一类,这与其地理区域分布基本吻合。同样样地的荒地阿魏,有些亲缘关系较近,被聚为一类,这可能与试验材料来源地的环境和材料来源地周围其他品种的生长影响有关,不同个体之间的种质可能发生了基因交流,相互渗透,使得地域阻隔减弱,其亲缘关系的远近与来源相关性不大^[17]。在亲缘关系上,遗传距离越小,遗传一致性越大,则种质资源间的亲缘关系也就越近^[18],从聚类结果中可看出,来源于 2 号群体的 58 和 59 号样品之间,遗传相似系数为 0.828 7,遗传距离最小,故表现出很强的亲缘性,推测其可能来自于同一个亲本。不同个体的亲缘关系,与其所处的地理位置、生态环境及基因交流的现象具有一定的联系,同时也与种质资源在适应异质生境中产生的遗传变异和适应能力有一定关系。本研究揭示了荒地阿魏 3 个原生地环境中不同个体间的遗传多样性及其遗传距离情况,研究结果显示,荒地阿魏在遗传多样性上还未表现出濒危特性,说明荒地阿魏对环境变化的适应能力较强,其进化的潜力也较大,为新疆地产药材荒地阿魏的资源保护及开展人工育种提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 单人骅,余孟兰. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 徐海燕,王延蛟,徐瞰海,等. 濒危药用植物新疆阿魏遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(20): 148-149.
- [3] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kephart S R. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 5112-5115.
- [4] 朱田田,晋玲,张裴斯,等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3549-3557.
- [5] 王岚. 用 ISSR 分子标记研究川产道地药用植物川芎的遗传多样性 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [6] 郭丁丁,马逾英,唐琳,等. 白芷种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1627-1630.
- [7] 刘义梅,朱毅,熊永兴,等. 基于 ISSR 标记的白花前胡种质资源遗传多样性分析 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1982-1984.
- [8] 赵香妍,刘长利,薛文峰,等. 北京地区野生柴胡种质资源的 ISSR 研究 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1008-1013.
- [9] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [10] 朱岩芳,祝水金,李永平,等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用 [J]. 种子, 2010, 29(2): 55-59.
- [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(2): 132-140.
- [12] Sarwat M, Das S, Srivastava P S. Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(3): 519-528.
- [13] Souframanien, Gopalakrishna T. A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(8): 1687-1693.
- [14] 李华,史美荣,肖娅萍. 绞股蓝种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1666-1672.
- [15] Ding G, Li X, Ding X, et al. Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers [J]. *Genetika*, 2009, 45(3): 375-82.
- [16] Gaudeul, Taberlet P, Till-Bottraud i. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(10): 1625-1637.
- [17] 宋常美,文晓鹏,杨尔泰. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1531-1538.
- [18] 卜静,王冬梅,李登武. 不同产地野生玉竹种质资源多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1824-1828.