

基于 ISSR 标记的麻花艽遗传多样性分析

王 笠¹, 赵志礼^{1*}, 倪梁红¹, 嘎 务², 米 玛²

1. 上海中医药大学中药学院 生药学教研室, 上海 201203

2. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000

摘 要: 目的 探讨秦艽基原植物之一麻花艽 *Gentiana straminea* 的遗传多样性, 并构建 DNA 指纹谱。方法 在其自然分布区广泛取样, 共涉及西藏、青海、甘肃及四川等地 28 个居群 83 份样本, 应用 ISSR 分子标记技术, POPGEN 软件分析遗传信息参数, NTSYS 软件构建亲缘关系 UPGMA 聚类图。结果 从 100 条引物中筛选出 7 条多态性好、条带清晰的引物用于 ISSR 分析。共检测到 95 个条带, 其中多态性条带 88 个, 多态性条带百分率 (PPL) 为 92.63%; 麻花艽居群间的期望杂合度 (H_e) 为 0.288 2, 多样性信息指数 (I_m) 为 0.437 1, 种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.678 3, 基因流 (N_m) 为 0.237 1, 遗传距离为 0.074 3~0.490 0。UPGMA 树将麻花艽居群主要分为 2 大支。结论 麻花艽种群遗传多样性水平较高, 居群间遗传多样性水平高于居群内; 其遗传变异主要存在于居群间; 遗传特性与地理分布具有一定相关性。该工作可为麻花艽品种鉴定、物种就地保护、探讨环境等因素对于遗传分化的影响及药材道地性研究提供基础资料。

关键词: 麻花艽; ISSR; 遗传多样性; DNA 指纹谱; 多态性条带百分率

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3168-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.024

Assessment of genetic diversity on *Gentiana straminea* based on ISSR markers

WANG Li¹, ZHAO Zhi-li¹, NI Liang-hong¹, GAAWE Dorje², MI Ma²

1. Department of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

2. Tibetan Traditional Medical College, Lhasa 850000, China

Abstract: Objective To assess the genetic diversity of *Gentiana straminea* (Gentianaceae). **Methods** Intersimple sequence repeat (ISSR) markers were used. Twenty-eight populations (83 individuals) of *G. straminea* were sampled from Sichuan, Qinghai, Gansu provinces, and Autonomous Region of Tibet. ISSR data were analyzed with the program POPGEN, and a UPGMA dendrogram was constructed. **Results** PCR products corresponding to 183 alleles at 95 loci, amplified by the seven primers were scored. Eighty-eight loci were polymorphic. Expected heterozygosity (H_e) and Shannon's information index (I_m) were 0.288 2 and 0.437 1, respectively. Nei's coefficient of genetic differentiation (G_{st}) and gene flow (N_m) were 0.678 3 and 0.237 1 at the population level, respectively. The genetic distance varied from 0.074 3 to 0.490 0. *G. straminea* populations were mainly divided into two branches by UPGMA tree. **Conclusion** Genetic diversity level of *G. straminea* is high, and genetic diversity level among populations of *G. straminea* is higher than that in one population; Its autogenous variation mainly exist among populations; Hereditary capacity has certain correlation with geographical distribution. This work contributes basic information for variety identification, species in situ conservation, and environment investigation on the influence of heredity differentiated and Chinese Materia Medica genuine study. The congruence between genetic distance and geographic distances is high.

Key words: *Gentiana straminea* Maxim.; ISSR; genetic diversity; DNA fingerprinting; PPL

麻花艽 *Gentiana straminea* Maxim. 为龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 多年生草本植物, 主要分布于我国西藏、青海、四川、甘肃等地, 生于海拔 2 000~4 950 m 的山坡草地、河滩、灌丛、林缘、

高山草甸^[1]。麻花艽为《中国药典》2015 年版一部中秦艽 4 种基原植物之一, 根入药, 具有祛风湿、清湿热、退虚热、止痹痛的功效^[2]。同时, 麻花艽也是藏药“解吉嘎保”的基原植物之一^[3]。近年来,

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173654)

作者简介: 王 笠 (1987—), 男, 硕士生, 研究方向为中药资源与品种鉴定。

*通信作者 赵志礼, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与品种鉴定工作。Tel: (021)51322202 E-mail: zhilzhao@sohu.com

随着市场需求不断增加, 秦艽药材已出现供不应求之势, 而麻花艽作为药用秦艽的重要来源之一, 多生长于西部高山地区, 生态环境恶劣; 加之过度采挖, 资源状况不容乐观, 现已被列入《国家重点保护野生药材物种名录》^[4], 因此对其进行保护更显紧迫。同时, 麻花艽作为广布种, 生长环境复杂多样, 其遗传背景如何、化学成分谱亦是值得关注的重要问题。

ISSR (Intersimple sequence repeat) 即简单重复序列间区, 是由 Zietkiewicz 等^[5]创建的一种 DNA 分子标记技术, 用于检测简单重复序列间 DNA 序列差异。该技术具有实验成本低, 操作简单、快速、高效等优点, 已被广泛应用于植物种质资源鉴定、

遗传多样性等方面的研究中^[6-7]。本研究应用该标记技术对不同居群的麻花艽进行遗传多样性分析, 以期对麻花艽的品种鉴定、资源保护、可持续利用及道地性研究提供基础资料。

1 材料

自采标本, 同时取新鲜叶片, 经硅胶快速干燥, 备用。共采集甘肃、青海、四川和西藏地区 28 个居群 83 份麻花艽样品; 外类群: 龙胆属粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 和直萼龙胆 *G. erecto-sepala* T. N. Ho 分别作为秦艽组内、组外对照。凭证标本经上海中医药大学中药学院赵志礼教授鉴定, 存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室, 见表 1。

表 1 样品及凭证标本

Table 1 Samples and voucher specimens

物种	凭证标本	编号	样本数	采集地
麻花艽	GS201302	GS2 (1~3)	3	甘肃省玛曲县县城附近
	GS201303	GS3 (1~3)	3	甘肃省玛曲县县城附近
	GS201305	GS5 (1~3)	3	甘肃省合作县县城附近
	GS201307	GS7 (1~3)	3	甘肃省夏河县县城附近
	QH201301	Q1 (1~3)	3	青海省泽库县县城旁幸福山
	QH201303	Q3 (1~3)	3	青海省泽库县萨拉山
	QH201305	Q5 (1~3)	3	青海省泽库县夏达日草场
	QH201308	Q8 (1~3)	3	青海省河南县尕欠村
	QH201309	Q9 (1~3)	3	青海省河南县城
	QH201311	Q11 (1~2)	2	青海省河南县城
	QH201312	Q12 (1~3)	3	青海省河南县柯生乡莫曲
	QH201313	Q13 (1~3)	3	青海省河南县柯生乡富桑曲
	20130803001	0803 (1~3)	3	青海省海北县晏西海镇
	QH201401	H1 (1~3)	3	青海省果洛州玛沁县大武镇
	QH201403	H3 (1~3)	3	青海省果洛州玛沁县拉加寺后山
	QH201407	H7 (1~3)	3	青海省果洛州班玛县城附近
	XZ201213	XZ13 (1~3)	3	西藏那曲地区巴青县城
	XZ201215	XZ15 (1~3)	3	西藏昌都地区丁青县协雄乡
	XZ201216	XZ16 (1~3)	3	西藏昌都地区丁青县协雄乡
	XM2	XM2 (1~3)	3	四川省若尔盖县辖曼乡
	2010SC002	SC2 (1~3)	3	四川省若尔盖县达格盖果乡
	2010SC003	SC3 (1~3)	3	四川省若尔盖县维英乡
	2010SC004	SC4 (1~3)	3	四川省若尔盖县辖曼乡
	2010SC005	SC5 (1~3)	3	四川省若尔盖县辖曼乡
	2010SC006	SC6 (1~3)	3	四川省若尔盖县辖曼乡哲蚌寺附近
	2010SC007	SC7 (1~3)	3	四川省若尔盖县辖曼乡哲蚌寺附近
	2010SC009	SC9 (1~3)	3	四川省若尔盖县达格盖果乡
	2010SC010	SC10 (1~3)	3	四川省若尔盖县达格盖果乡
粗茎秦艽	XZ201214	CJ (1~3)	3	西藏昌都地区丁青县协雄乡
直萼龙胆	XZ201309	ZE (1~3)	3	西藏林芝地区色季拉山山口

2 方法

2.1 总 DNA 提取及检测

取适量干燥叶片加入液氮研磨成细粉末状, 采用改良 CTAB 法^[8]提取植物基因组 DNA, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果; 紫外分光光度计检测总 DNA 浓度与纯度, 并稀释至 10 ng/ μ L, 保存于 -20 °C 冰箱备用。

2.2 ISSR-PCR 引物筛选及反应体系优化

参考秦鲜艳等^[9]的方法, 从加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条引物中筛选出 7 条多态性好、扩增条带清晰的引物用于 ISSR 扩增。对反应中的参数进行单因素考察, 确定最终反应体系为 10 μ L, 内含 MgCl₂ 缓冲液 2.5 mmol/L, 引物 0.8 μ mol/L, dNTPs 0.25 mmol/L, Taq 酶 0.75 U 以及 DNA 模板约 10 ng。对各条引物的最佳退火温度进行考察, 以上述优化好的体系作为基础, 每条引物各自的解链温度 (T_m 值) 作参考值, 上下各浮动 6 °C, 通过梯度 PCR 仪自动生成 12 个温度梯度, 以扩增条带多且明亮、背景清晰者为佳 (表 2)。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 49~56 °C (根据不同引物的退火温度) 复性 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 38 个循环; 之后 72 °C 延伸 7 min 结束。

2.3 PCR 产物检测

用筛选出的 7 条 ISSR 引物, 按其最佳退火温度 (表 2) 对样品分别进行扩增。扩增产物于 0.5 $\times$ TBE 缓冲液、1.2% 琼脂糖凝胶、5 V/cm 电压下电泳分离; 电泳 80 min 后, 在凝胶成像系统下成像并拍照记录。

2.4 数据统计与分析

人工读带。在相同迁移率位置, 按扩增阳性 (记

为 “1”) 和扩增阴性 (记为 “0”) 记录电泳谱带, 建立 0/1 矩阵。利用 POPGEN 软件计算居群内及居群间的等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、期望杂合度 (H_e)、多样性信息指数 (I_m) 与多态位点百分率 (PPL)、居群总遗传变异 (H_t)、居群间的遗传分化系数 (G_{st})、基因流 (N_m) 和居群间 Nei 无偏遗传距离; 用 NTSYS 软件构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 ISSR 扩增结果

用筛选出的 7 条 ISSR 引物对所有麻花苳样品进行扩增和电泳检测。结果显示, 扩增片断 230~2 200 bp。7 条引物分别扩增出 10~19 个条带, 共得到 95 条清晰的条带, 平均单条引物扩增条带数为 13.6。其中, 引物 UBC810 扩增的条带数最多, 为 19 条, UBC855 最少, 为 10 条。每个引物扩增出的 PPL 在 72.73%~100.00%, 其中 UBC810、UBC855、UBC864 和 UBC884 PPL 到 100% (表 2), 引物 UBC825 对麻花苳的扩增结果见图 1。

3.2 遗传多样性分析

获得的 95 条谱带中, 多态性条带为 88 条, PPL 为 92.63%, 表明麻花苳物种内有较高的遗传多样性; 而不同居群内的 PPL 为 12.63%~37.89%, 其中最高的是 GS3 (甘肃玛曲); 最低的是 XZ16 (西藏昌都)。POPGEN 软件分析结果表明, H_e 为 0.288 2, I_m 为 0.437 1。不同居群 H_e 为 0.053 7~0.152 0, I_m 为 0.077 4~0.220 8, H_e 和 I_m 的大小与各 PPL 的高低趋势基本一致, 各项系数均是居群 GS5 (甘肃合作) 最高, 居群 XZ16 (西藏昌都) 最低 (表 3)。

表 2 ISSR 引物及其扩增结果

Table 2 Primers used in ISSR analysis, number of scored and polymorphic loci, and primer-specific annealing temperature

引物序号	引物序列 (5'-3')	扩增条带数	多态性条带数	PPL/%	最佳退火温度/°C
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAT	19	19	100.00	51.2
UBC825	ACACACACACACACT	12	9	75.00	51.2
UBC828	TGTGTGTGTGTGTGA	11	8	72.73	49.6
UBC855	ACACACACACACACYT	10	10	100.00	52.8
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	16	16	100.00	50.3
UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	13	13	100.00	55.1
UBC885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	14	13	92.86	52.7

Y = (C, T); B = (C, G, T); H = (A, G, T)

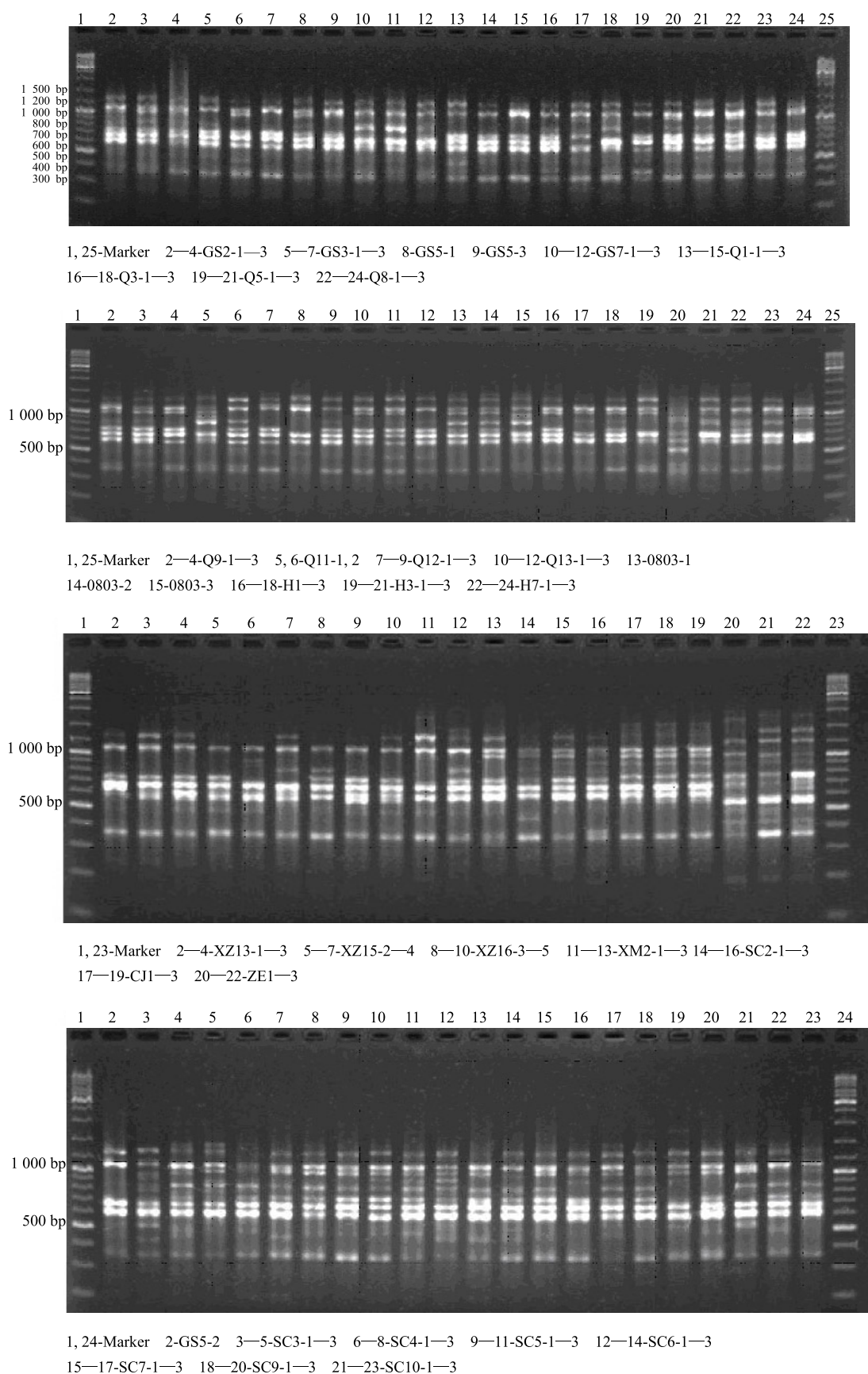


图 1 引物 UBC825 对 83 份麻花苳样品及外类群的扩增结果

Fig. 1 Typical ISSR marker banding patterns for *G. straminea* and outgroups using primer UBC825

表 3 麻花苳遗传信息参数

Table 3 Genetic variability within populations of *G. straminea*, detected by ISSR analysis

居群编号	总条带数	多态性条带数	PPL/%	N_a	N_e	H_e	I_m
GS2	95	19	20.00	1.200 0	1.261 7	0.085 7	0.123 3
GS3	95	36	37.89	1.378 9	1.200 8	0.149 2	0.219 4
GS5	95	35	36.84	1.368 4	1.273 8	0.152 0	0.220 8
GS7	95	17	17.89	1.178 9	1.126 3	0.071 5	0.104 7
Q1	95	18	18.95	1.189 5	1.136 4	0.076 6	0.111 8
Q3	95	29	30.53	1.305 3	1.224 6	0.125 2	0.182 1
Q5	95	24	25.26	1.252 6	1.180 0	0.101 5	0.148 4
Q8	95	18	18.95	1.189 5	1.119 8	0.070 7	0.105 4
Q9	95	18	18.95	1.189 5	1.158 5	0.084 5	0.120 4
Q11	95	16	16.84	1.168 4	1.119 1	0.069 8	0.101 8
Q12	95	24	25.26	1.252 6	1.191 0	0.105 4	0.152 7
Q13	95	27	28.42	1.284 2	1.193 5	0.110 9	0.163 5
0803	95	21	22.11	1.221 1	1.160 9	0.090 0	0.131 2
H1	95	27	28.42	1.284 2	1.182 4	0.107 0	0.159 1
H3	95	19	20.00	1.200 0	1.135 3	0.077 8	0.114 7
H7	95	20	21.05	1.210 5	1.150 9	0.084 9	0.124 0
XZ13	95	14	14.74	1.147 4	1.118 4	0.064 0	0.091 8
XZ15	95	16	16.84	1.168 4	1.099 7	0.060 4	0.091 0
XZ16	95	12	12.63	1.126 3	1.098 3	0.053 7	0.077 4
XM2	95	18	18.95	1.189 5	1.125 3	0.072 6	0.107 5
SC2	95	19	20.00	1.200 0	1.118 8	0.071 8	0.108 2
SC3	95	28	29.47	1.294 7	1.192 5	0.112 1	0.166 3
SC4	95	20	21.05	1.210 5	1.150 9	0.084 9	0.124 0
SC5	95	21	22.11	1.221 1	1.160 9	0.090 0	0.131 2
SC6	95	29	30.53	1.305 3	1.208 0	0.119 2	0.175 6
SC7	95	26	27.37	1.273 7	1.189 0	0.107 8	0.158 4
SC9	95	19	20.00	1.200 0	1.135 3	0.077 8	0.114 7
SC10	95	28	29.47	1.294 7	1.220 1	0.122 0	0.177 1
总计	95	88	92.63	1.926 3	1.486 8	0.288 2	0.437 1

3.3 遗传结构与遗传分化

通过 Popgen32 软件分析,得到麻花苳各居群的 H_t 为 0.288 6, H_e 为 0.092 8, G_{st} 为 0.678 3, 表明总的遗传变异有 67.83%来自于居群间的分化, 32.17%来自于居群内分化;反映出 28 个不同麻花苳居群间的遗传多样性较高, 居群内的分化较低, 大部分变异存在于居群间。由 G_{st} 计算出的居群间 N_m 为 0.237 1, 说明不同麻花苳居群之间的交流不够, 遗传漂变就成为种群遗传结构的主导因素^[10-11]。麻花苳生长在西部高山地带, 推测由于高山环境的阻隔, 使得麻花苳居群之间的基因交流变得相对困难, 可能是导

致基因流较低的重要原因之一。

3.4 遗传距离与聚类分析

统计结果显示, 麻花苳不同居群之间遗传距离的变异范围为 0.074 3~0.490 0, 其中 SC3 (四川省若尔盖县) 与 GS7 (甘肃省夏河县) 之间的遗传距离最大, 为 0.490 0, 表明两者之间的亲缘关系最远。SC5 (四川省若尔盖县辖曼乡) 和 SC6 (四川省若尔盖县辖曼乡哲蚌寺附近) 之间的遗传距离最近, 为 0.074 3, 说明二者之间亲缘关系最近。

为了进一步探讨麻花苳各居群间的亲缘关系, 在加入 2 个外类群后, 利用 NTSYS 软件对所得遗

传一致度进行 UPGMA 聚类 (图 2)。通过聚类图可以看出, 外类群直萼龙胆 (ZE) 与粗茎秦艽 (CJ) 首先各聚为一支, 与所有麻花苳居群分开, 说明所选用的 ISSR 标记适用于麻花苳种内的遗传多样性分析。除了 GS7 (甘肃省夏河县) 居群独立聚为一支外, 麻花苳其他各居群分为 2 大类, 第 1 大类包含了 11 个居群, 分为 2 个亚类, 第 1 个亚类为四川地区 8 个居群, 第 2 个亚类为西藏地区 3 个居群; 第 2 大类包含了 16 个居群, 除了 XM2 (四川省若尔盖县) 为四川地区样品外其余都是甘肃和青海地区居群。

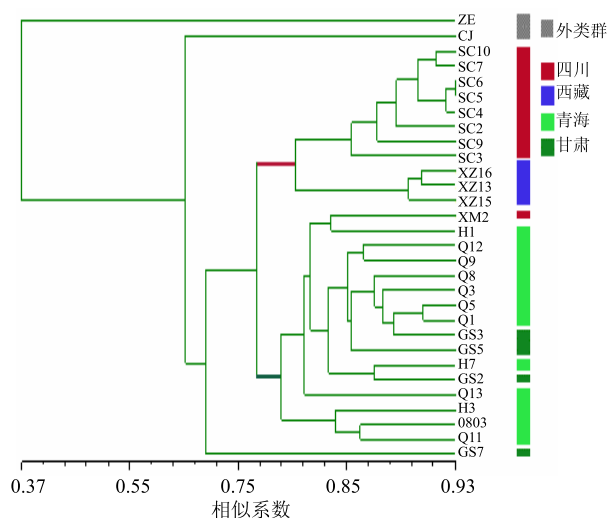


图 2 麻花苳居群 UPGMA 聚类树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *G. straminea* based on ISSR analysis

4 讨论

遗传多样性评价是种质资源研究中的重要内容之一^[12]。通过与近年来文献报道的其他物种 ISSR 研究结果及相关分析数据进行比较^[13-15], 可以推测麻花苳具有较高的遗传多样性。麻花苳能够在较广范围内生长, 对环境也有较好的适应能力, 多样的遗传背景是其重要原因。目前, 麻花苳资源呈减少趋势, 并非在于物种遗传多样性不丰富, 人为的过度采挖及对生境的破坏或许是一个重要的因素。因此, 建立有效的保护措施是当务之急。从地域分布来看, 甘肃地区的 2 个居群 (GS3、GS5) 表现出最高的遗传多样性; 青海、四川地区样品多样性也较高; 而西藏地区麻花苳居群的多态性均最低, 提示该地区的种群适应性可能不强。推测其原因, 西藏相关产地的高落差海拔及复杂的地质环境, 造成与其他居群的基因交流受阻。因此, 在全面保护麻

花苳种质资源的同时, 尤其应尽快对该地区种质资源制定保护策略。

聚类结果显示, 麻花苳的种下亲缘关系与地理分布间呈现一定相关性, 这与许多研究结果相似^[16-17]。在遗传一致度为 0.77 处将麻花苳 27 个居群分为 2 个大支, 分别为西藏、四川居群一支与青海、甘肃居群一支。西藏、四川居群一支: 西藏巴青县与丁青县 3 个居群共聚为一小支, 显示了较为近缘的系统关系; 四川省若尔盖县所有 9 个居群中, 除 1 个居群位于青海、甘肃居群支中, 其他 8 居群共聚为一小支, 显示了彼此高度的同源性; 同时上述西藏、四川 11 居群共聚为一大支。青海、甘肃居群一支: 除四川省 1 个居群外, 来自青海省的 12 居群及甘肃省 3 个居群样本均在这一大支。值得注意的是, GS7 (甘肃省夏河县) 在一致度为 0.72 处首先独立出一支; 在实地取样时该居群样品周围生长有大量近缘种小秦艽, 推测两者可能存在杂交现象, 该问题有待后续进一步研究。

在前期对麻花苳考察过程中注意到, 不同地区的麻花苳植物形态差异较大, 广域分布的麻花苳体现了形态上丰富的多样性。西藏地区的麻花苳植株普遍较矮小, 莲座丛叶较为细长, 花序排列较为宽松, 花冠上斑点较少; 而四川地区麻花苳植株较高, 花序排列较紧密; 甘肃、青海地区则发现麻花苳与管花秦艽等近缘种存在同域分布情况。近缘种间是否存在自然杂交现象, 不同产地、不同基因背景的麻花苳在有效分量及药材品质上是否存在差异? 下一步工作应尽快开展不同居群间的化学成分多样性评价, 以期对麻花苳药材质量标准修定及品种选育工作提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 62 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 杨永昌. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [4] 周秀佳, 徐宏发, 顺庆生. 中药资源学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007.
- [5] 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.
- [6] 许永华, 张爱华, 金慧, 等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [7] 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.
- [8] Stewart C N J, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR application [J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 748-749.
- [9] 秦鲜艳, 赵志礼, 孟千万, 等. 粗茎秦艽 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(10): 25-28.
- [10] 黄 玮, 孙 平, 张文生, 等. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 453-457.
- [11] 高 丽, 杨 波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 250-257.
- [12] 倪梁红, 赵志礼, 孟千万, 等. 西藏麻花艽种质资源的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3212-3215.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 张旻桓, 金晓玲, 成仿云, 等. 湖南产牡丹遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1193-1198.
- [16] 郝 东, 尹海波, 赵晓雨, 等. 牻牛儿苗种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 147-150.
- [17] 王 薇, 刘 超, 崔九成, 等. 珠子参种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2525-2529.