

基于 ISSR、SCoT、SRAP 标记的川续断属药用植物亲缘关系研究

陈大霞^{1,2,3,5}, 张雪^{1,2,3}, 王钰^{1,2,3}, 潘媛^{1,2,3}, 李隆云^{1,2,3*}, 易思荣⁴, 张泽⁵

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065
2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065
3. 中国中医科学院中药资源中心 重庆分中心, 重庆 400065
4. 重庆市药物种植研究所, 重庆 404100
5. 重庆大学生命科学学院, 重庆 400044

摘要: 目的 研究 9 种川续断属药用植物的亲缘关系。方法 采用 ISSR、SCoT、SRAP 3 种分子标记进行多态性检测, TREECONW 分析软件计算遗传距离, UPGMA 方法构建树状聚类图。结果 ISSR、SCoT、SRAP 标记揭示的多态百分率差异不大, 分别为 90.4%、88.5%、88.2%, 均表明供试材料的遗传多态性极为丰富; 3 种标记均揭示日本续断与大头续断之间遗传距离最大, 表明二者亲缘关系最远; 3 种标记均将川续断属 9 种药用植物聚为 3 类, 即大头续断与丽江续断、深紫续断与日本续断分别聚为一类, 峨眉续断单独为一支, 其余 4 个种聚为一类; ISSR 标记和 SRAP 标记的聚类结果基本相同, 仅是大理续断和川续断聚类先后略有差异。结论 3 种标记的聚类结果与经典分类具有很好的吻合度, 证实了分子标记技术的可靠性, 可作为川续断属植物亲缘关系研究的有效方法之一。

关键词: 川续断属; ISSR; SCoT; SRAP; 亲缘关系

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0903-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.025

Analysis on genetic relationship of medicinal species of *Dipsacus* marked by ISSR, SCoT, and SRAP

CHEN Da-xia^{1,2,3,5}, ZHANG Xue^{1,2,3}, WANG Yu^{1,2,3}, PAN Yuan^{1,2,3}, LI Long-yun^{1,2,3}, YI Si-rong⁴, ZHANG Ze⁵

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
2. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
3. Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Chongqing 400065, China
4. Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 404100, China
5. College of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: Objective To detect the genetic relationship among nine medicinal species of *Dipsacus* in China. **Methods** The polymorphic bands were detected by three labeling methods (ISSR, SCoT, and SRAP). The genetic distances were calculated by TREECONW software and the systematic diagram of genetic relationship was clustered by UPGMA method. **Results** The percentage of polymorphism by ISSR, SCoT and SRAP markers showed little difference with value at 90.4%, 88.5%, and 88.2%, respectively, which indicated that the genetic polymorphism of the tested materials was very rich. The genetic distance between *Dipsacus chinensis* and *D. japonicus* was the largest, which indicated their genetic relationship was the most distant. Nine medicinal species of *Dipsacus* were all divided into three groups by three markers, that *D. chinensi* and *D. lijiangensis*, *D. asperoides* and *D. japonicas* were respectively clustered into one group, *D. asperoides* var. *omiensis* was alone clustered, the other four species were clustered into one group. The clustering results labeled by ISSR and SRAP were basically the same with a slight difference between *D. daliensis* and *D. asperoides*. **Conclusion** The clustering results by

收稿日期: 2017-07-06

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI06A11-09); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21); 重庆市特色效益农业中药材产业技术体系资助(2017[S]号); 重庆市“科技平台与基地建设”项目资助(cstc2014ptyjd10001); 国家科技部科技人员服务企业行动项目(2009GJF10045)

作者简介: 陈大霞, 研究员, 主要从事药用植物分子生物学和中药材种植技术研究。Tel: (023)89029016 E-mail: 17837@163.com

*通信作者 李隆云, 研究员, 主要从事药用植物栽培与质量评价研究。Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

these markers was between well consistent with the classical classification, which confirmed that molecular markers can be used as one of the effective methods to reveal the genetic relationship among medicinal species of *Dipsacus*.

Key words: *Dipsacus* Linn.; ISSR; SCoT; SRAP; genetic relationship

川续断属 *Dipsacus* Linn. 为茜草目川续断科多年生草本植物, 全世界约 30 种, 分布于亚洲、欧洲及热带非洲。据调查, 中国有川续断属植物 18 种 2 变种 (包括 2 个栽培种), 分布区域广阔, 西南各省区 (包括西藏) 为分布中心, 其中有 9 种 2 变种可做药用^[1]。目前, 我国川续断属药用植物的研究大多集中于驯化栽培、化学成分及药理作用等方面, 对亲缘关系的研究及鉴别主要偏重于外部形态特征^[1-2]、主根的显微特征^[3]及花粉形态^[4]等的比较, 近年来分子标记的应用也有所报道^[5-8]。对于外部形态如花色、果球大小、植株高矮差异显著的种, 分类地位争议较小, 但某些种间差异极细微的种, 分类地位争议颇大。续断作为常用中药材, 《中国药典》2015 年版收载的基原植物仅为川续断 *D. asperoides* C. Y. Cheng et T. M. Ai, 目前药材也主要来源于野生采集, 但因该种常与其他种伴生, 药农在采挖川续断时, 易混入日本续断 *D. japonicus* Miq.、康定续断 *D. kangdingensis* T. M. Ai et X. F. Feng、大头续断 *D. chinensis* Bat. 等伴生种, 导致其来源十分混乱, 而传统的形态、显微等鉴别方法, 对于以根入药的续断药材的鉴别存在准确性和客观性不足的问题。

随着分子标记技术的日益丰富和创新, 分子标记在药用植物亲缘关系研究中的应用已越来越广泛, 其中简单重复序列间扩增多态性 (inter simple sequence repeat, ISSR)^[9]、目标起始密码子多态性 (start codon targeted polymorphism, SCoT)^[10]及相关序列扩增多态性标记 (sequence-related amplified

polymorphism, SRAP)^[11]为较常用分子标记。这 3 种分子标记扩增基因组的不同区域, 具有无需预先克隆和测序, 引物在物种之间通用性高、操作快速简便、成本低廉、扩增效率高、多态丰富等优点, 已广泛应用于植物的种质鉴定、亲缘关系分析和遗传多样性的检测及遗传图谱构建等方面。本实验采用 3 种分子标记 (ISSR、SCoT、SRAP), 对川续断属植物分布中心——中国西南地区的 9 种川续断属药用植物的亲缘关系进行了研究, 以期为其药材基原鉴定、资源的合理利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的川续断属药用植物每种均采集 10 个单株, 根据均匀分布、随机取样的方法采集植株的幼嫩叶片或未开放果球, 洗净晾干后, 分散包埋于装有硅胶的自封袋, 并及时检查干燥情况, 及时添加或更换新的硅胶。样品快速干燥后, 用灭菌后的镊子取出叶片或花蕾, 用于提取基因组 DNA。各样品经重庆市药物研究所易思荣研究员鉴定, 保存于重庆市中药研究院标本馆。样品信息见表 1。

1.2 仪器与试剂

S1000 Thermal Cycler PCR 仪、Gel Doc XR 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)、DYY-6C 型电泳仪、DYCP-34A 电泳槽 (北京六一公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根)、ISSR、SCoT、SRAP 引物 (由上海生工合成)、GelRed 核酸凝胶染料 (美国 Biotium 公司)、DNA Marker (北京全式金有限公司)、TaqDNA 聚合酶 (日

表 1 所用材料

Table 1 Materials used in this study

材料名称	拉丁名	来源	海拔/m	经度	纬度
大头续断	<i>D. chinensis</i>	云南中甸	3 270	99°24'07"	27°31'35"
丽江续断	<i>D. lijiangensis</i>	云南丽江	2 770	100°01'08"	27° 01'03"
深紫续断	<i>D. asperoides</i>	重庆南川	2 012	107°06'46"	29°01'04"
日本续断	<i>D. japonicus</i>	贵州道真	465	107°14'45"	29°02'35"
康定续断	<i>D. kangdingensis</i>	四川康定	2 700	101°34'24"	30°00'58"
峨眉续断	<i>D. asperoides</i> var. <i>omiensis</i>	四川洪雅	1 790	103°09'14"	29°18'18"
川续断	<i>D. asperoides</i>	湖北鹤峰	1 370	110°34'24"	29°49'40"
多裂续断	<i>D. daliensis</i> var. <i>multifidus</i>	云南鲁甸	2 930	99°14'22"	27°05'19"
大理续断	<i>D. daliensis</i>	云南大理	2 740	99°35'31"	26°12'11"

本 Toyobo 公司)、dNTPs (日本 TOYOBO 公司)、琼脂糖(进口分装); Tris 等其余试剂为国产分析纯。

1.3 基因组 DNA 提取

每种川续断属药用植物的 10 个单株采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取基因组 DNA,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取效果和完整性。用紫外分光光度计测定浓度和纯度后,放置在-20 °C 冰箱中保存。使用时,将 10 个单株的基因组 DNA 等量混合组成“基因池”,质量浓度为 40 ng/μL,用于扩增。

1.4 ISSR、SCoT、SRAP 标记的扩增

3 种分子标记的扩增反应体系总体积为 15 μL,体积不足部分用灭菌超纯水补足。

1.4.1 ISSR 反应体系 1×PCR buffer、Mg²⁺ 1.5 mmol/L、dNTPs 200 μmol/L、引物 0.3 μmol/L、模板 40 ng、TaqDNA 聚合酶 1 U。ISSR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环;循环结束后 72 °C 延伸 7 min; 12 °C 保存。36 条 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的引物,从中筛选出 27 条扩增条带信号强、背景清晰、具有多态性的引物用于 ISSR-PCR 扩增,引物序列见表 2。

1.4.2 SCoT 反应体系 1×PCR buffer、Mg²⁺ 1.5 mmol/L、dNTPs 200 μmol/L、引物 0.4 μmol/L、模板 40 ng、TaqDNA 聚合酶 1 U。SCoT 扩增程序:94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 36 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 12 °C 保存。SCoT 引物采用 Collard 和 Mackill^[10]开发的引物,共 36 条,从中筛选出 30 条用于正式的 PCR 扩增,具体引物的序列见表 3。

1.4.3 SRAP 反应体系 1×PCR buffer、Mg²⁺ 2.0 mmol/L、dNTPs 200 μmol/L、引物各 0.2 μmol/L、模板 40 ng、TaqDNA 聚合酶 1 U。SRAP 扩增程序采用复性变温法:94 °C 预变性 5min; 前 5 个循环为 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min; 后 35 个循环为 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min; 72 °C 延伸 7 min; 12 °C 保存。SRAP 引物参照 Li 等^[11]已发表的引物,具体序列见表 4。

1.5 扩增产物的检测

将 PCR 扩增产物 5 μL 与 6×DNA Loading buffer 2.5 μL(内含 GelRed 核酸凝胶染料)混匀后,以 1×TAE 为电泳缓冲液在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳

表 2 ISSR 扩增引物及多态性

Table 2 ISSR amplification primers and its polymorphism

引物	序列 (5'→3')	总条带数	多态性条带数	多态率/%
UBC807	(AG) ₈ T	11	8	72.7
UBC808	(AG) ₈ C	12	11	91.7
UBC809	(AG) ₈ G	9	7	77.8
UBC810	(GA) ₈ T	13	13	100.0
UBC811	(GA) ₈ C	5	3	60.0
UBC815	(CT) ₈ G	12	11	91.7
UBC817	(CA) ₈ A	12	11	91.7
UBC818	(CA) ₈ G	10	10	100.0
UBC822	(TC) ₈ A	15	12	80.0
UBC825	(AC) ₈ T	8	7	87.5
UBC828	(TG) ₈ A	9	8	88.9
UBC835	(AG) ₈ YC	15	15	100.0
UBC836	(AG) ₈ YA	10	9	90.0
UBC841	(GA) ₈ YC	10	8	80.0
UBC842	(GA) ₈ YG	11	11	100.0
UBC844	(CT) ₈ RC	18	17	94.4
UBC848	(CA) ₈ RG	8	7	87.5
UBC853	(TC) ₈ RT	12	12	100.0
UBC855	(AC) ₈ YT	14	12	85.7
UBC856	(AC) ₈ YA	14	13	92.9
UBC857	(AC) ₈ YG	12	10	83.3
UBC866	(CTC) ₆	16	16	100.0
UBC868	(GAA) ₆	15	15	100.0
UBC873	(GACA) ₄	11	10	90.9
UBC881	(GGGTG) ₃	2	2	100.0
UBC888	BDB (CA) ₇	10	8	80.0
UBC891	HVH (TG) ₇	9	8	88.9

R = (A, G) Y = (C, T) B = (C, G, T) (i.e. not A) D = (A, G, T) (i.e. not C) H = (A, C, T) (i.e. not G) V = (A, C, G) (i.e. not T)

分离,电压 150 V。当电泳至溴酚蓝指示剂距凝胶前沿大约 2~3 cm 时停止,取出凝胶在成像系统上观察,并照相保存。

1.6 数据的采集、统计、分析

根据扩增条带的电泳迁移率及其有无进行“0, 1”二元数据的统计,有带记“1”,无带记“0”。根据 3 种分子标记的扩增结果,遗传距离用 TREECONW (Version 1.3) 分析软件进行计算,树状聚类图采用 UPGMA (unweighted pair group method arithmetic averages) 方法构建。

表 3 SCoT 引物序列及扩增结果

Table 3 Primers sequences and amplification results of SCoT

引物	序列 (5'→3')	总条带数	多态性条带数	多态率/%
SP3	CAACAATGGCTACCACCG	6	5	83.3
SP4	CAACAATGGCTACCACCT	8	6	75.0
SP5	CAACAATGGCTACCACGA	11	8	72.7
SP6	CAACAATGGCTACCACGC	15	15	100.0
SP8	CAACAATGGCTACCACGT	15	13	86.7
SP9	CAACAATGGCTACCAGCA	10	6	60.0
SP10	CAACAATGGCTACCAGCC	9	7	77.8
SP12	ACGACATGGCGACCAAC	9	8	88.9
SP13	ACGACATGGCGACCATCG	12	10	83.3
SP14	ACGACATGGCGACCACG	12	12	100.0
SP15	ACGACATGGCGACCGCG	21	21	100.0
SP16	ACCATGGCTACCACCGAC	12	11	91.7
SP17	ACCATGGCTACCACCGAG	22	22	100.0
SP18	ACCATGGCTACCACCGCC	5	4	80.0
SP19	ACCATGGCTACCACCGGC	15	14	93.3
SP20	ACCATGGCTACCACCGCG	15	12	80.0
SP22	AACCATGGCTACCACCAC	4	2	50.0
SP23	CACCATGGCTACCACCAG	21	20	95.2
SP24	CACCATGGCTACCACCAT	11	10	90.9
SP25	ACCATGGCTACCACCGGG	17	17	100.0
SP26	ACCATGGCTACCACCGTC	14	13	92.9
SP27	ACCATGGCTACCACCGTG	18	18	100.0
SP28	CCATGGCTACCACCGCCA	8	8	100.0
SP29	CCATGGCTACCACCGCC	9	6	66.7
SP30	CCATGGCTACCACCGCG	6	4	66.7
SP31	CCATGGCTACCACCGCCT	9	7	77.8
SP32	CCATGGCTACCACCGCAC	14	12	85.7
SP33	CCATGGCTACCACCGCAG	19	19	100.0
SP34	ACCATGGCTACCACCGCA	17	13	76.5
SP35	CATGGCTACCACCGGCC	11	9	81.8

2 结果与分析

2.1 3 种分子标记的遗传多态性比较

3 种分子标记每条引物或引物组合的扩增统计结果见表 2、3、5。ISSR 标记的多态性比率在 80%~100%，平均为 90.4%；SCoT 标记的多态性比率范围为 50%~100%，平均 88.5%；SRAP 标记的多态性比率范围为 33%~100%，平均 88.2%。3 种标记的扩增条带数范围差异较大，其他如平均条带数、多态性比率均差异不大，共同揭示供试川续断属 9 种药用植物的多态性极为丰富（表 6）。

2.2 种间遗传距离分析

遗传距离直观地反映物种之间亲缘关系的远近。用 TREECONW 软件计算出了基于 3 种标记的川续断属 9 种药用植物之间的遗传距离（表 7~9）。

3 种标记揭示的遗传距离变化幅度较大，平均值差异不明显（表 10），其中 ISSR 标记和 SCoT 标记揭示的遗传距离的范围差异不大，SCoT 标记和 SRAP 标记揭示的遗传距离平均值几乎一致。3 种标记均揭示日本续断与大头续断之间遗传距离最大，表明亲缘关系最远。SCoT 标记与 SRAP 标记揭示多裂续断与大理续断之间遗传距离最小，而 ISSR 标记则揭示多裂续断与川续断之间遗传距离最小。川续断、大理续断、多裂续断、康定续断两两之间的遗传距离均较小，表明它们之间亲缘关系较近。

2.3 基于 3 种分子标记的聚类分析

供试材料间的遗传距离采用 TREECONW 软件计算，按 UPGMA 法建立亲缘关系树状图（图 1~3）。3 种标记均将川续断属 9 种药用植物聚为 4 类，即大头续断与丽江续断聚为一类，深紫续断与日本续断聚为一类，峨眉续断独为一支，其余 4 个

表 4 SRAP 引物序列与名称

Table 4 Sequences (5'→3') and names of SRAP primers used in this study

名称	上游引物 (5'→3')	名称	下游引物 (5'→3')
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME6	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME7	TGAGTCCAAACCGGTCC	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA
ME8	TGAGTCCAAACCGGTGC	EM8	GACTGCGTACGAATTCTG
ME9	TGAGTCCAAACCGGTAG	EM9	GACTGCGTACGAATTCGA
		EM10	GACTGCGTACGAATTGAG
		EM11	GACTGCGTACGAATTCCA
		EM12	GACTGCGTACGAATTGAT

表 5 36 个 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 5 Amplification results of 36 combined SRAP primers

引物组合	总带数	多态性带数	多态性比率/%	引物组合	总带数	多态性带数	多态性比率/%
ME2-EM5	17	16	94.1	ME7-EM5	10	7	70.0
ME2-EM8	12	11	91.7	ME7-EM10	15	13	86.7
ME3-EM2	12	12	100.0	ME7-EM11	15	13	86.7
ME4-EM1	12	11	91.7	ME7-EM12	7	3	42.9
ME4-EM2	11	11	100.0	ME8-EM3	13	13	100.0
ME4-EM4	8	4	50.0	ME8-EM4	12	11	91.7
ME4-EM8	15	14	93.3	ME8-EM5	8	6	75.0
ME5-EM1	15	12	80.0	ME8-EM9	15	14	93.3
ME5-EM2	15	14	93.3	ME9-EM1	12	11	91.7
ME6-EM1	6	4	66.7	ME9-EM2	9	8	88.9
ME6-EM2	13	13	100.0	ME9-EM3	6	5	83.3
ME6-EM3	7	6	85.7	ME9-EM4	23	22	95.7
ME6-EM7	11	10	90.9	ME9-EM5	14	13	92.9
ME6-EM8	16	13	81.3	ME9-EM7	18	17	94.4
ME6-EM9	18	18	100.0	ME9-EM9	19	17	89.5
ME6-EM10	17	17	100.0	ME9-EM10	14	13	92.9
ME7-EM2	13	12	92.3	ME9-EM12	6	2	33.3
ME7-EM4	10	8	80.0				

表 6 3 种分子标记的扩增结果比较

Table 6 Comparison on amplification results of three molecular markers

标记类型	引物数	条带数范围	平均条带数	多态性条带数范围	平均多态性条带数	多态率/%
ISSR	27	2~18	11.2	2~17	10.1	90.4
SCoT	30	4~22	12.5	2~22	11.1	88.5
SRAP	36	6~23	12.5	2~22	11.0	88.2

表 7 基于 ISSR 标记揭示的种间遗传距离

Table 7 Genetic distance among species based on ISSR markers

样本	深紫续断	日本续断	康定续断	多裂续断	大理续断	丽江续断	大头续断	峨眉续断	川续断
深紫续断	0.000 0								
日本续断	0.269 4	0.000 0							
康定续断	0.567 3	0.590 2	0.000 0						
多裂续断	0.569 4	0.592 2	0.148 7	0.000 0					
大理续断	0.585 3	0.607 5	0.172 4	0.088 2	0.000 0				
丽江续断	0.611 7	0.625 6	0.562 5	0.544 0	0.552 2	0.000 0			
大头续断	0.623 8	0.638 2	0.563 8	0.555 6	0.563 5	0.161 3	0.000 0		
峨眉续断	0.625 6	0.629 6	0.443 9	0.436 9	0.457 9	0.477 8	0.447 2	0.000 0	
川续断	0.584 5	0.607 8	0.171 0	0.082 5	0.108 9	0.560 2	0.561 5	0.451 0	0.000 0

种聚为一类。基于 ISSR 标记与 SRAP 标记的聚类结果基本一致，差异仅在于大理续断、川续断与多裂续断的聚类先后，其中 SRAP 标记与传统形态分类高度吻合。SCoT 标记与另 2 种标记聚类结果的

最大差异在于大头续断与丽江续断先聚为一类，深紫续断与日本续断再聚为一类。相比较而言，ISSR 标记和 SRAP 标记的聚类结果与传统分类更为相似，尤其是 SRAP 标记。

表 8 基于 SCoT 标记揭示的种间遗传距离

Table 8 Genetic distance among species based on SCoT markers

样本	深紫续断	日本续断	康定续断	多裂续断	大理续断	丽江续断	大头续断	峨眉续断	川续断
深紫续断	0.000 0								
日本续断	0.379 6	0.000 0							
康定续断	0.491 5	0.488 6	0.000 0						
多裂续断	0.450 8	0.481 5	0.155 2	0.000 0					
大理续断	0.477 9	0.498 2	0.164 6	0.077 6	0.000 0				
丽江续断	0.593 8	0.611 3	0.549 2	0.555 6	0.548 6	0.000 0			
大头续断	0.595 3	0.638 3	0.567 4	0.565 2	0.565 9	0.237 7	0.000 0		
峨眉续断	0.485 7	0.527 7	0.347 6	0.336 1	0.325 2	0.565 2	0.559 1	0.000 0	
川续断	0.491 5	0.496 2	0.151 8	0.137 9	0.122 4	0.541 0	0.567 4	0.339 1	0.000 0

表 9 基于 SRAP 标记揭示的种间遗传距离

Table 9 Genetic distance among species based on SRAP markers

样本	深紫续断	日本续断	康定续断	多裂续断	大理续断	丽江续断	大头续断	峨眉续断	川续断
深紫续断	0.000 0								
日本续断	0.402 4	0.000 0							
康定续断	0.492 2	0.558 4	0.000 0						
多裂续断	0.478 3	0.556 3	0.202 7	0.000 0					
大理续断	0.465 1	0.584 1	0.162 3	0.138 3	0.000 0				
丽江续断	0.510 8	0.557 6	0.503 3	0.488 5	0.500 0	0.000 0			
大头续断	0.553 6	0.598 8	0.542 9	0.534 6	0.532 3	0.191 2	0.000 0		
峨眉续断	0.403 7	0.518 8	0.428 6	0.414 5	0.427 7	0.442 6	0.459 1	0.000 0	
川续断	0.492 1	0.565 5	0.190 5	0.158 3	0.144 7	0.496 6	0.537 0	0.427 6	0.000 0

表 10 基于 3 种分子标记的遗传距离比较

Table 10 Comparison on genetic distance based on three molecular markers

标记类型	遗传距离	平均值	亲缘关系最近	亲缘关系最远
ISSR	0.088 2~0.638 2	0.467 8	多裂续断与川续断	日本续断与大头续断
SCoT	0.077 6~0.638 3	0.435 8	多裂续断与大理续断	
SRAP	0.138 3~0.598 8	0.435 0	多裂续断与大理续断	

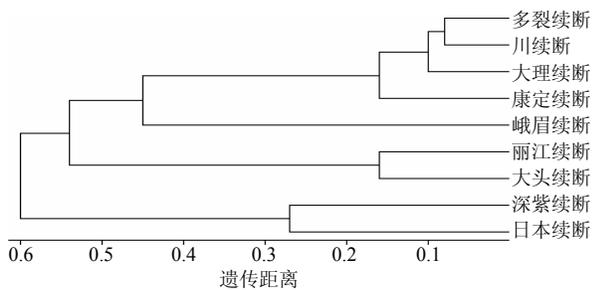


图 1 基于 ISSR 标记的川续断属 9 种药用植物聚类图
Fig. 1 Dendrogram of nine medicinal plants from *Dipsacus* based on ISSR

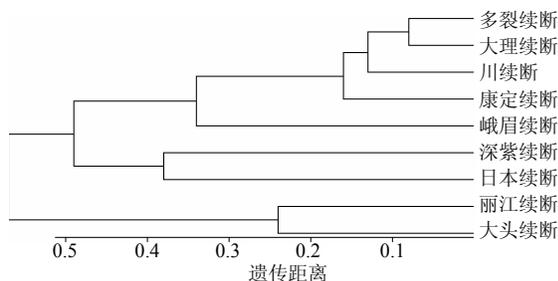


图 2 基于 SCoT 标记的川续断属 9 种药用植物聚类图
Fig. 2 Dendrogram of nine medicinal plants from *Dipsacus* based on SCoT

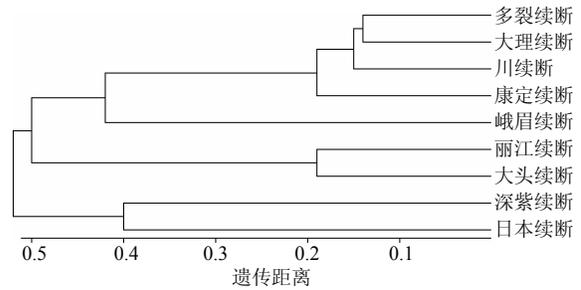


图 3 基于 SRAP 标记的川续断属植物聚类图
Fig. 3 Dendrogram of nine medicinal plants from *Dipsacus* based on SRAP

3 讨论

3.1 与形态分类的比较

川续断属植物外部形态差异主要表现在花冠颜色、头状花序大小、小苞片顶端喙尖长度等方面，对于外部形态差异显著的种易于鉴别与分类，但某些外部形态差异较为细微的种鉴别较难，分类地位争议较大。就本实验供试的 9 种川续断属药用植物而言，文献报道基于形态标记的传统分类首先根据花冠颜色将深紫续断与日本续断聚为一类，再将头状花序大的丽江续断与大头续断聚为一类，余下头

状花序小的种聚为一类^[1-2]。本实验中 ISSR 标记和 SRAP 标记的聚类结果与之相同, SCoT 标记的聚类结果仅在聚类的先后上有细微差异(即丽江续断与大头续断先聚类,深紫续断与日本续断后聚类),因此,本实验中 3 种标记的聚类结果总体上与传统的形态分类具有较好的吻合度,证实了分子标记技术应用于川续断属药用植物亲缘关系研究是可行的。SRAP 标记在小分支上与传统的形态分类也高度吻合,为优选分子标记。

本实验分子标记揭示的结果与形态标记分类也有一定差异,如峨眉续断为川续断变种,传统分类将二者聚在同一支,但本实验 3 种标记的聚类结果均显示峨眉续断独为一支。实地调查发现,峨眉续断主要生长于阴暗潮湿的林下、路旁,种子较少,可以通过主茎落地生根进行无性繁殖,叶顶端的裂片为宽的长椭圆形,由此可见峨眉续断与其原变种川续断在生境、繁殖方式及叶片形态上均有较大差异,二者之间的亲缘关系值得进一步研究。

3.2 分子标记间的比较

本实验不同标记之间的差异主要体现在聚类树的小分支上,如 ISSR 标记揭示多裂续断与川续断亲缘关系更近,而 SCoT 标记与 SRAP 标记则揭示多裂续断与大理续断亲缘关系更近。李晓玲等^[7-8]采用 ISSR 标记和 SRAP 标记分析了 5 种川续断属植物(川续断、大理续断、恩施续断、日本续断、深紫续断、大头续断)的亲缘关系,揭示川续断、大理续断、恩施续断亲缘关系较近,但日本续断与深紫续断并未按照花冠颜色聚类,与形态分类和本实验的结果不相一致。

本实验采用的 3 种分子标记虽然扩增的区段不同,但在扩增条带多态性比率、遗传距离平均值以及聚类上差异并不大,均证实日本续断与大头续断遗传距离最大,亲缘关系最远。李晓玲等^[7-8]同样证实 ISSR 标记和 SRAP 标记之间的聚类结果差异不大。陈大霞等^[6]采 SRAP 标记分析了我国 8 种川续断属药用植物的群体遗传关系,种间的聚类结果

与本实验高度一致,证实扩增模板无论是个体还是混合 DNA “基因池”均能有效揭示川续断属药用植物的亲缘关系,为此,实际应用中可以采用一定数量植株的混合 DNA “基因池”作为扩增模板,快速鉴定川续断属药用植物,明确其亲缘关系。

参考文献

- [1] 陈虎彪,艾铁民. 中国续断科药用植物资源 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(11): 650-651.
- [2] 艾铁民,陈虎彪,程志铭,等. 中国续断属修订 [J]. 植物研究, 1990, 10(3): 1-18.
- [3] 艾强,周涛,江维克,等. 川续断种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2155-2159.
- [4] 冯学锋,艾铁民,徐海宁. 续断属花粉形态研究 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 394-401.
- [5] 雷美艳,陈晓辰,马晓冲,等. 基于 ITS2 条形码序列鉴定中药材续断及其混伪品 [J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(3): 265-269.
- [6] 陈大霞,张雪,王钰,等. 中国川续断属药用种遗传多样性与亲缘关系的 SRAP 分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2559-2564.
- [7] 李晓玲,杨进,张雄,等. 10 份续断属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 植物研究, 2015, 35(3): 450-456.
- [8] 李晓玲,程岁寒,杨进. 续断属植物 SRAP 标记的遗传亲缘关系分析 [J]. 西南农业学报, 2016, 29(7): 1554-1558.
- [9] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [10] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 86-89.
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brossica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2): 455-461.