

贵州不同产地粗毛淫羊藿药用植物遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析

石建明¹, 李牡丹², 杨 鹏¹, 陈兴银¹, 彭昌琴¹, 刘 鑫¹, 关 萍^{1*}

1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025

2. 广东省国基教育发展研究院, 广东 广州 511400

摘 要: **目的** 对贵州不同产地粗毛淫羊藿样品的遗传多样性和亲缘关系进行分析。**方法** 利用 PopGene 32 软件及 NTsys2.10e 软件分析贵州 5 个不同产地粗毛淫羊藿的遗传多样性及亲缘关系, 并根据 UPGMA 法, 构建亲缘关系树状图。

结果 从 100 个随机引物中筛选出 13 条多态性稳定、条带清晰的引物, 结果表明, 共扩增出 211 个位点, 从物种水平上看, 共有 205 个多态性位点, 多态性百分率 (PPB) 为 97.16%, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.455 7, Nei's 基因多样性指数 (H_e) 为 0.297 3, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.490 2, 5 个居群间总的遗传多样性 (H_t) 为 0.297 3, 而居群内的遗传多样性 (H_s) 为 0.207 5, 表明粗毛淫羊藿的遗传变异主要存在于群体内, 种群内的遗传分化大于种群间。利用 UPGMA 法构建的居群遗传距离聚类树, 表明, 5 个居群被分为 2 支, 其中来自安顺、花溪、高坡的 3 个居群聚在一支, 来自龙里和雷山的 2 个居群共同聚为一支。**结论** ISSR 分子标记技术可以用于贵州不同产地的粗毛淫羊藿植物的遗传多样性和亲缘关系分析。

关键词: 粗毛淫羊藿; ISSR; 遗传多样性; 亲缘关系; UPGMA 法

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3122-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.025

ISSR analysis of genetic diversity and relationship among medicinal plants of *Epimedium acuminatum* from different habitats in Guizhou ProvinceSHI Jian-ming¹, LI Mu-dan², YANG Peng¹, CHEN Xing-yin¹, PENG Chang-qin¹, LIU Xin¹, GUAN Ping¹

1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. Guangdong Institute of National Basic Education Development and Research, Guangzhou 511400, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and relationship of *Epimedium acuminatum* from different habitats in Guizhou Province. **Methods** PopGene 32 software and NTsys2.10e software was used to analyze the genetic diversity and phylogenetic relationship of five different habitats in Guizhou Province, and phylogenetic tree was constructed according to the UPGMA method. **Results** A total of 13 polymorphic and clear bands were screened from 100 random primers showed that amplified 211 bands, of which 205 were polymorphic from the level of species, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 97.16%. The Shannon's information index (I) was 0.455 7; Nei's gene diversity index (H_e) was 0.297 3; The effective number (N_e) of alleles was 1.490 2; The total genetic diversity (H_t) of five populations was 0.297 3, while the population genetic diversity within the group (H_s) was 0.207 5, indicated that the genetic variation mainly existed within populations, genetic differentiation within population than that of population between. The population genetic distance clustering was built by UPGMA. The results showed that five populations were divided into two branches, three populations from Anshun, Huaxi, and Gaopo clustered into one branch, and the other two populations from Longli and Leishan populations clustered into one branch. **Conclusion** ISSR molecular marker technique can be used to analyze the genetic diversity and phylogenetic relationship of *Epimedium acuminatum* from different habitats in Guizhou Province.

Key words: *Epimedium acuminatum* Franch.; ISSR; genetic diversity; genetic relationship; UPGMA method

粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum* Franch. 隶 是我国有悠久的药用植物, 具有强筋骨、祛风湿、
属小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 *Epimedium* L. 补肾壮阳等功效^[2]。贵州的粗毛淫羊藿因产量高且
多年生草本植物, 广泛分布于西南及华中地区^[1], 质量好被收载于《贵州省中药材、民族药材质量标

收稿日期: 2017-12-16

基金项目: 贵州省社会发展攻关课题 (201303137); 中央高校基本业务费一般项目 (XDJK2016C006)

作者简介: 石建明 (1962—), 男, 副教授, 研究方向为植物学。E-mail: guanp@163.com

*通信作者 关 萍, 女, 博士, 教授, 主要从事植物学、分子生物学及植物生物技术研究。E-mail: guanp@163.com

准》2003年版,但是随着医药业的快速发展,使得人们对粗毛淫羊藿药用原料的需求不断扩大,导致野生粗毛淫羊藿资源不断锐减,为有效合理地保护和利用资源,有必要对粗毛淫羊藿的遗传多样性进行研究。

ISSR (inter simple sequence repeat) 分子标记技术是加拿大科学家蒙特利尔大学教授 Zietkiewicz 于 1994 年提出的一种新型的分子标记技术^[3]。该技术结合了 RAPD 和 SSR 的优点,具有操作简单、成本低、稳定性好等优势,备受广大科研工作者的青睐^[4]。当前,有关 ISSR 分子标记技术被广泛应用于中药材种质资源遗传多样性研究^[5]。阿力同·米克等^[6]对新疆南部黑果枸杞 6 个自然居群及甘肃 2 个自然居群进行了 ISSR 遗传多态性研究;孙红梅等^[7]利用 ISSR 技术对卷柏科药用植物种间进行了遗传多样性分析;陈燕英等^[8]利用 ISSR 分子标记对 7 种 12 居群的川产淫羊藿属植物进行遗传多样性及亲缘关系分析;罗玥信等^[9]对 6 种委陵菜属药用植物进行了 ISSR 分析,但目前尚未发现利用 ISSR 分子标记技术对粗毛淫羊藿的不同居群进行研究。本研究首次利用 ISSR 分子标记技术对贵州 5 个产地的粗毛淫羊藿居群进行遗传多样性研分析,旨在从分子水平了解贵州不同居群粗毛淫羊藿的遗传结构和遗传多样性,为粗毛淫羊藿遗传资源的检测、保护和利用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以贵阳市高坡地区为中心向四周辐射 5 个区域采集粗毛淫羊藿植株,每个居群分别取 10 个样本。每个采样点根据粗毛淫羊藿的分布情况随机采样,每个个体间距至少 5 m,共采集 50 个样本,采样后立即用硅胶干燥留存备用。药材经贵州大学植物学实验室石建明副教授鉴定为粗毛淫羊藿 *Epimedium acuminatum* Franch., 编号及来源见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、ISSR 引物筛选及 PCR 扩增

表 1 粗毛淫羊藿的来源及编号

Table 1 Origin and numer of *E. acuminatum*

序号	居群代号	采集地	采样数
1	AS	贵州安顺	10
2	GP	贵阳高坡	10
3	LS	贵州雷山	10
4	HX	贵阳花溪	10
5	LL	贵州龙里	10

物总 DNA 采用天根公司(北京)的新型植物基因组 DNA 试剂盒提取,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,用紫外分光光度法检测 DNA 的质量浓度。ISSR 引物根据加拿大哥伦比亚大学(简称 UBC)公布的 100 条引物序列,并从中筛选出扩增条带清晰、多态性高、重复性好的引物 13 条(表 2),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增试剂采用天根公司的 2×Taq PCR MasterMix, PCR 扩增具体程序为 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 反应结束后 4℃ 保存, PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳凝胶检测,并拍照留存。

表 2 ISSR 分析的引物

Table 2 Primer for ISSR analysis

序号	引物名称	引物序列 (3'-5')	退火温度/℃
1	808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52.0
2	809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	51.5
3	810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52.0
4	812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	52.5
5	824	TCTCTCTCTCTCTCG	52.0
6	825	ACACACACACACACACT	52.0
7	826	ACACACACACACACACC	51.0
8	827	ACACACACACACACACG	51.0
9	836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52.0
10	840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	53.0
11	842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	52.0
12	852	TCTCTCTCTCTCTCRA	51.0
13	856	ACACACACACACACACYA	51.5

1.2.2 数据统计与分析 电泳图谱以其清晰可重复为基本原则,按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计与聚类分析,将 ISSR 电泳结果图进行人工读带,不考虑带的强弱,有带的记为“1”,无带的记为“0”,扩增带形成 0/1 格式构建 ISSR 表型数据,用 Excel 软件对数据建立二元矩阵。利用 POPGENE1.32 软件计算多态位点百分率(PPB)、观测等位遗传标记数(N_a)、有效等位遗传标记数(N_e)、居群总遗传多样性(H_t)、居群内遗传多样性(H_s)、各居群间的遗传分化指数(G_{st})、基因流(N_m)、Nei's 遗传多样性(H_c)、Nei's 遗传距离(D)、Shannon's 信息指数(I)。利用 NTsys 软件构建系统聚类树,Nei's 遗传距离按不加权重对算术平均法进

行计算^[10]。

2 结果与分析

2.1 ISSR 遗传多样性分析

通过筛选出来的 13 条引物对全部样品进行 ISSR 多态性检测, 部分引物扩增结果见图 1。13 个引物共扩增出 211 条清晰、可重复的 DNA 带。通过对 5 个居群的粗毛淫羊藿进行 ISSR 遗传多样性分析结果表明(表 3), 安顺(AS)、高坡(GP)、雷山(LS)、花溪(HX)、龙里(LL)5 个居群的 PPB 分别为 67.77%、55.92%、57.35%、63.51%、67.77%。其中安顺和龙里的多态百分率最高(67.77%), 雷山的最低(57.35%)。可见不同分布区的粗毛淫羊藿的遗传变异有较大的差异, 这说明分布于贵州的粗毛淫羊藿资源蕴藏着较为丰富

的遗传多样性。 H_e 在 0.189 9~0.220 3, 平均值为 0.207 5; I 在 0.285 9~0.334 6, 平均值 0.313 5。从表 3 看出, 各居群的 PPB、 I 和 H_e 的大小变化趋势基本一致。

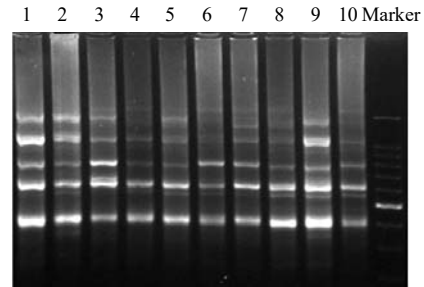


图 1 引物 UBC826 对高坡地区 10 个样品的 ISSR 扩增结果
Fig. 1 Results of ISSR amplification of 10 material from Gaopo by primer UBC826

表 3 居群内的遗传多样性
Table 3 Genetic variability within populations

居群	多态性位点	PPB/%	N_a	N_e	H_e	I
安顺(AS)	143	67.77	1.677 7	1.364 4	0.217 0	0.330 3
高坡(GP)	118	55.92	1.559 2	1.322 8	0.189 9	0.285 9
雷山(LS)	121	57.35	1.573 5	1.343 4	0.198 8	0.297 3
花溪(HX)	134	63.51	1.635 1	1.357 5	0.211 6	0.319 6
龙里(LL)	143	67.77	1.677 7	1.368 5	0.220 3	0.334 6
平均	131	62.46	1.624 6	1.351 3	0.207 5	0.313 5
物种水平	205	97.16	1.971 6	1.490 2	0.297 3	0.455 7

2.2 居群间的遗传变异分析

通过对粗毛淫羊藿种群间和种群内的遗传分化及基因流分析, 结果显示, 5 个居群间总的 H_t 为 0.297 3, 而居群内的 H_s 为 0.207 5。表明粗毛淫羊藿居群间和居群内都存在一定的遗传分化。根据 H_t 和 H_s 计算不同群体间 G_{st} , 显示 5 个粗毛淫羊藿群体间 G_{st} 为 0.302 0, 表明总的遗传变异中有 30.2% 的变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 69.8%, 说明遗传变异主要存在于群体内, 且种群内的遗传分化大于种群间的遗传分化。居群间每代个体的 N_m 为 1.155 5, 说明种群间存在一定的基因流动。

2.3 粗毛淫羊藿居群间的聚类分析

通过对粗毛淫羊藿各群体间遗传一致度和遗传距离(D)分析(表 4), 结果显示遗传一致度值的变化范围为 0.811 6~0.910 3, 其平均值为 0.858 5, D 值变化范围为 0.094 0~0.208 7, 平均值为 0.153 2。其中花溪(HX)和安顺(AS)的遗传一致度最高,

雷山(LL)和高坡(GP)的遗传一致度最低。利用 UPGMA 法对不同居群遗传关系构建聚类图(图 2)。结果显示, 5 个居群被明显的分为 2 支, 安顺、花溪、高坡 3 个居群聚在一支, 表明这 3 个地区的粗毛淫羊藿亲缘关系相对近。龙里和雷山共同聚为一支, 表明这两个地区的粗毛淫羊藿亲缘关系较近。

3 讨论

3.1 遗传多样性

遗传多样性在物种的进化和发展中起到基础性的作用, 对物种的进化和新物种的出现有着重要的作用^[11]。本研究中 5 个粗毛淫羊藿居群间 H_t 为 0.297 3, 而 H_s 为 0.207 5, 粗毛淫羊藿 G_{st} 为 0.302 0, 表明总的遗传变异中有 30.2% 的变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 69.8%, 说明粗毛淫羊藿遗传变异主要存在于群体内, 即种群内的遗传分化大于种群间的遗传分化。裴利宽等^[12]通过 HPLC 指纹图谱法对淫羊藿属植物进行研究结果显示, 淫羊藿物种内变异很大, 与本研究结果一致。

表 4 Nei's 遗传一致度 (右上角) 和遗传距离 (左下角)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of *Epimedium* L. in ISSR analysis

居群	AS	GP	LS	HX	LL
AS	****	0.903 0	0.840 1	0.910 3	0.853 3
GP	0.102 1	****	0.821 9	0.874 9	0.811 6
LS	0.174 2	0.196 1	****	0.839 2	0.883 2
HX	0.094 0	0.133 6	0.175 3	****	0.847 4
LL	0.158 7	0.208 7	0.124 2	0.165 6	****

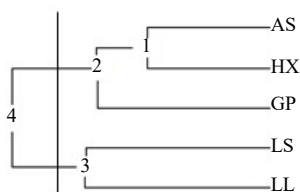


图 2 5 个地区的粗毛淫羊藿群体间的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *E. acuminatum* in five regions

植物居群的遗传多样性受到自然环境等诸多因素的影响,如种子的散布方式、繁育方式、海拔高度、气候差异、温湿度等^[13]。其中繁育方式是导致遗传多样性最为明显的条件之一,远交、杂交等能促进植物拥有较高的居群遗传多样性^[14],种子散播机制明显影响遗传变异的分布,如靠重力、附着和果实破裂而散种子的物种 G_{st} 值较高,是由于其后代向外扩散能力有限,从而加剧种群间的分化^[15]。权秋梅等^[16]对巫山淫羊藿研究表明,巫山淫羊藿的繁育方式主要为异花授粉,由此可见,淫羊藿属植物的这种异花授粉亲和方式是形成淫羊藿居群内变异的主要成因。Hamrick 等^[17]研究证明,传粉方式为异交传粉的植物其遗传平均分化系数 0.2,而自交传粉的植物其平均分化系数仅为 0.51。本研究结果表明,粗毛淫羊藿 G_{st} 为 0.302 0,接近与异交传粉植物,这与权秋梅等^[16]研究一致。

植物的传粉和种子的传播都是生物产生 N_m 的重要因素之一,而基因流又是导致种群内遗传分化的主要因素。Wright^[18]研究认为,当 $N_m > 1$ 时,表明种群间存在一定的基因流动,本研究中,粗毛淫羊藿居群间每代个体的 N_m 为 1.155 5,表明粗毛淫羊藿的 5 个种群间存在一定的基因流动。可能存在的原因是居群样本间的地理间隔太小,加上粗毛淫羊藿属于广亲和的花粉供体兼受体,具有较高的种间杂交结实率,所以导致个居群间发生基因交流的频率比较高。

3.2 粗毛淫羊藿居群的聚类分析

根据 Nei's 遗传距离,利用 UPGMA 法构建的居群遗传距离聚类树,结果表明,来自安顺和花溪的粗毛淫羊藿共同聚为一支,再与来自高坡的粗毛淫羊藿聚为一支,表明这 3 个地区的粗毛淫羊藿亲缘关系相对近。而来自龙里和雷山的粗毛淫羊藿共同聚为一支,表明这 2 个地区的粗毛淫羊藿亲缘关系比较近。一般认为,植物种群间的遗传变异与该物种的地理分布有着密切的关系,且遗传距离越小,遗传一致性就越大,种群间的亲缘关系也就越近^[19-20]。本研究中,就地理分布位置来看(图 3),靠近东侧地区的粗毛淫羊藿聚为一支,靠近西侧的地区粗毛淫羊藿聚为一支。从地理距离来看,花溪与高坡的距离要小于与安顺的距离,但来自花溪的粗毛淫羊藿与安顺的粗毛淫羊藿亲缘关系要大于与来自高坡的亲缘关系,这可能与相互引种等存在一定关系,其原因需进一步研究。

3.3 粗毛淫羊藿资源的保护和利用

粗毛淫羊藿植物是贵州的地区性淫羊藿药材品种,对其利用完全依赖野生资源,但是其栖息地因为野生资源的大量挖掘而遭到严重的破坏,其资源已消耗严重^[21]。进行遗传多样性的研究是对物种进行保护、合理利用和遗传改良的基础,了解物种遗传多样性水平和遗传变异的空间分布格局对制



图 3 粗毛淫羊藿群体间地理分布图

Fig. 3 Geographical distribution map of *E. acuminatum*

定科学的基因资源保护策略具有重要的作用。鉴于本研究结果显示粗毛淫羊藿遗传多样性主要存在于居群内,所以在遗传改良工作中优良种源、优良个体和优良群体的选择不容忽视。为了有效保护粗毛淫羊藿的遗传多样性,建议在进行粗毛淫羊藿的栽培中多采用模拟原生态环境的种植方式,通过群体内的个体间移栽提高群体间的基因交流。由于粗毛淫羊藿主要以地下越冬芽的形式进行繁殖,建议采取人为推广种子繁殖的方式或分子育种的手段尽可能最大限度地保护和丰富其遗传多样性。本研究的 5 个居群中来自安顺和龙里的粗毛淫羊藿遗传多样性最高,这 2 个地区可作为贵州粗毛淫羊藿遗传多样性保护的地区,其次龙里地区粗毛淫羊藿产藏量大^[22],为粗毛淫羊藿优良种质资源的选育和遗传改良提供了基础。

参考文献

- [1] 郭宝林,肖培根. 中国淫羊藿属药用植物种类和地理分布研究 [J]. 中药材, 1993, 16(7): 14-17.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 (精选本上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [3] 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.
- [4] Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128(1): 9-17.
- [5] Kumar A, Mishra P, Singh S C, et al. Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L. a medicinal plant [J]. *Plant System Evol*, 2014, 300(6): 1409-1420.
- [6] 阿力同·其米克, 王青锋, 杨春锋, 等. 新疆产药用植物黑果枸杞遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物科学学报, 2013, 31(5): 517-524.
- [7] 孙红梅, 谷 巍, 耿 超, 等. 卷柏科药用植物种间遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物生理学报, 2016, 52(3): 277-284.
- [8] 陈燕英, 黎云祥, 权秋梅, 等. 7 种川产淫羊藿属植物遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 植物研究, 2012, 32(2): 208-212.
- [9] 罗玥佳, 陈丹娜, 李 妍, 等. 6 种委陵菜属药用植物的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2736-2739.
- [10] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
- [11] Amos W, Harwood J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations [J]. *Philosoph Trans Royal Soc Lond*, 1998, 353(1366): 177-186.
- [12] 裴利宽, 郭宝林, 黄文华. 淫羊藿属主要资源种类的 HPLC 指纹图谱特征和种类鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1662-1668.
- [13] Hu Y P, Li W, Xie X L, et al. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis [J]. *Biochem System Ecol*, 2010, 38(3): 264-274.
- [14] Fang J, Chao C C T, Roberts P A, et al. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata*, (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54(6): 1197-1209.
- [15] Clair J B S, Kilkenny F F, Johnson R C, et al. Genetic variation in adaptive traits and seed transfer zones for *Pseudoroegneria spicata* (bluebunch wheatgrass) in the northwestern United States [J]. *Evol Appl*, 2013, 6(6): 933-948.
- [16] 权秋梅, 黎云祥. 巫山淫羊藿开花物候与生殖特征 [J]. 生态学杂志, 2013, 32(4): 859-866.
- [17] Brown A D H, Clegg M T, Kehler A L, et al. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sinauer: Sinauer Associates, 1989.
- [18] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Bull Mathemat Biol*, 1990, 52(1/2): 241-295.
- [19] 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.
- [20] 邱亚玲, 秦民坚, 戴轶群, 等. 不同产地猫豆遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 86-90.
- [21] 童 红, 江维克, 周 涛, 等. 贵州粗毛淫羊藿资源的利用状况及存在的问题 [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 23-25.
- [22] 代 欣, 何顺志. 贵州龙里县药用植物资源的调查研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(3): 21-23.