

基于 ISSR 分子标记的金莲花种质资源遗传多样性分析

闫欣然¹, 曹晓宇², 王志轩², 高 婧^{2*}

1. 承德医学院中药研究所 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

2. 承德市食品药品检验检测中心 河北省燕山地区道地药材检验检测技术创新中心, 河北 承德 067000

摘要:目的 探究不同产地金莲花 *Trollius chinensis* 的亲缘关系和遗传多样性水平。方法 采用简单序列重复区间 (inter simple sequence repeat, ISSR) 技术对 27 份金莲花样本进行多态性分析、遗传多样性分析、遗传距离与聚类分析。结果 100 条引物中筛选出 5 条条带清晰的引物, 共扩增出 245 个位点, 其中有 218 个多态性位点, 平均多态性位点率达到 89.41%; 观察等位基因数 (The number of alleles, N_a) 为 1.67~2.00, 均值是 1.93, 有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e) 的范围为 1.531~1.682, 平均值是 1.600, N_a 和 N_e 的差异显示部分等位基因频率较高; Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index, h) 的范围为 0.300~0.380, 均值是 0.345, Shannon's 指数 (Shannon's information index, I) 为 0.428~0.558, 均值是 0.511, h 和 I 的差异可能是因为位点间异质性; 聚类结果显示 27 份样本可以分为 2 大类, 2 大类产地没有明显的地区特征, 推测为人工引种导致。结论 综合数据显示金莲花的遗传多样性水平处于中等, 为金莲花的品种选育以及可持续利用提供科学依据。

关键词: 金莲花; ISSR; 种质资源; 亲缘关系; 遗传多样性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5953-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.023

Genetic diversity analysis of *Trollius chinensis* germplasm resources based on ISSR molecular markers

YAN Xinran¹, CAO Xiaoyu², WANG Zhixuan², GAO Jing²

1. Hebei Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research and Development, Chengde Medical University, Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China

2. Chengde Food and Drug Inspection and Testing Center, Yanshan District Authentic Medicinal Materials Inspection and Testing Technology Innovation Center, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To explore the genetic relationship and genetic diversity of *Trollius chinensis* from different origins. **Methods** The polymorphism analysis, genetic diversity analysis, genetic distance and cluster analysis of 27 *T. chinensis* samples were conducted using the inter simple sequence repeat (ISSR) technique. **Results** A total of five clear banding patterns were selected from 100 primers, and a total of 245 loci were amplified, among which 218 were polymorphic loci, with an average polymorphism locus rate of 89.41%. The number of alleles (N_a) ranged from 1.67 to 2.00, with an average of 1.93, and the effective number of alleles (N_e) ranged from 1.531 to 1.682, with an average of 1.600. The difference between N_a and N_e indicated that some allele frequencies were relatively high. Nei's gene diversity index (h) ranged from 0.300 to 0.380, with an average of 0.345, and Shannon's information index (I) ranged from 0.428 to 0.558, with an average of 0.511. The difference between h and I might be due to the heterogeneity among sites. The cluster analysis showed that the 27 samples could be divided into two major categories, and there were no obvious regional characteristics between the two major categories, which was speculated to be due to artificial introduction. **Conclusion** The comprehensive data showed that the genetic diversity of *T. chinensis* is at a medium level, which provides a scientific basis for the breeding and sustainable use of *T. chinensis* in the future.

Key words: *Trollius chinensis* Bunge; ISSR; germplasm resources; genetic relationship; genetic diversity

收稿日期: 2025-03-03

基金项目: 承德市科技计划项目 (202305B007)

作者简介: 闫欣然 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。Tel: 18732934383 E-mail: 1804080309@qq.com

*通信作者: 高 婧 (1984—), 女, 满族, 硕士生导师, 高级工程师, 研究方向为中药分析。Tel: 18103141008 E-mail: 51913034@qq.com

金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 为毛茛科金莲花属多年生草本植物^[1]，主要产于河北、东北、内蒙古及山西等地区，大多生长在海拔 1 000~2 200 m 的高山草甸和疏林地带^[2]。金莲花最早记录在《本草纲目拾遗》，“味滑苦，无毒，性寒；治口疮喉肿、浮热牙宣、耳疼目痛、明目等，解岚瘴；疗疮，大毒诸风”^[3-4]，常用于治疗上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎等^[5]。经现代临床研究，金莲花所含化学成分为黄酮类、有机酸类、生物碱类等，具有抗菌、抗病毒、抗炎镇痛等药理活性^[6]，功能主治清热解毒、疏风散热^[7]。目前，金莲花的处方制剂和单方制剂有金莲花颗粒、金莲花胶囊、金莲花片等^[1]疗效明显，临床应用广泛。查阅文献记载有金莲花 *T. chinensis* Bunge、短瓣金莲花 *T. ledebouri* Reichb、宽瓣金莲花 *T. asiaticus* L、矮金莲花 *T. farreri* Stapf 等多个近种，理论上金莲花种质混杂，目前金莲花种质情况以及遗传性尚不很明确，本实验主要收集主产地市场上流通的金莲花对其进行遗传多样性评价，分析不同产地金莲花的亲缘关系远近，为之后优良品种的选育提

供参考。

简单重复序列区间（inter simple sequence repeat, ISSR）是一种基于微卫星系列新的分子标记技术，是通过在简单重复序列（simple sequence repeats, SSR）的 3'或 5'端加上 1~4 个碱基作为扩增引物，并通过 PCR 扩增两侧具有反向排列 SSR 的一段序列，具有不需要知道序列信息、简便、快捷、重复性好等特点^[8]，多用于植物遗传多样性、群体遗传结构及其亲缘关系等检测^[9]。

因此本实验将运用 ISSR 分子标记技术对不同主产地的金莲花进行遗传性分析，分析出不同产地金莲花的遗传距离和亲缘关系，更加了解金莲花的遗传结构，为以后金莲花的品种选育以及可持续利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验收集了不同产地的金莲花干燥花，样品经承德民族师范学院董建新教授鉴定均为金莲花 *T. chinensis* Bunge，主要收集于河北、山西、内蒙古、东北等地，收集信息见表 1。

表 1 样品信息
Table 1 Sample information

序号	采集地点	序号	采集地点
1	内蒙古自治区呼伦贝尔市	15	河北省承德市围场县
2	河北省承德市围场县	16	内蒙古自治区通辽市
3	内蒙古自治区乌海市	17	黑龙江省大兴安岭地区
4	河北省承德市围场县	18	河北省承德市围场县
5	内蒙古自治区	19	山西省忻州市五台县
6	河北省承德市双滦区宜家旺	20	河北省承德市
7	山西省忻州市五台县石咀村	21	河北省承德市围场县
8	河南省	22	内蒙古自治区包头市
9	内蒙古自治区呼伦贝尔市根河市	23	山西省忻州市五台县
10	内蒙古自治区赤峰市	24	内蒙古自治区呼和浩特市
11	内蒙古自治区呼和浩特市	25	吉林省通化市
12	内蒙古自治区呼伦贝尔市	26	河南省焦作市
13	内蒙古自治区锡林郭勒盟正蓝旗	27	黑龙江省大兴安岭地区
14	内蒙古自治区赤峰市		

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 FQP-A 型 PCR 检测系统（杭州博日科技股份有限公司）、DYY-7C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、ME204 型电子天平（梅特勒-托利多上海有限公司）、K8500 型化学发光凝胶成像系统（北京科创锐新生物科技有限公司）。

1.2.2 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒（上海

源叶生物科技有限公司）、DNA Marker（100~2 000 bp，上海源叶生物科技有限公司）、琼脂糖凝胶（上海源叶生物科技有限公司）、TAE（50×，上海碧云天生物技术有限公司）、DNA 上样缓冲液（6×，上海碧云天生物技术有限公司）、2×Taq PreMix（无染料）（中美泰和生物技术有限公司）、GelRed 核酸染料（Biotium）、氯仿、异戊醇等。

2 方法

2.1 金莲花 DNA 提取

取干燥的金莲花，研细，按照植物基因组 DNA 提取试剂盒提取，提取的 DNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 ISSR-PCR 反应体系与扩增程序

参考包金花等^[10]建立的金莲花 ISSR-PCR 反应体系，设置反应总体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$ ： $2\times\text{PCR PreMix}$ $25\text{ }\mu\text{L}$ ，引物 $1\text{ }\mu\text{L}$ ，DNA 模板 30 ng 。扩增程序： $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ， $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s ， $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 100 s ，共 38 个循环， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 引物筛选

对加拿大哥伦比亚大学（University of British Columbia, UBC）公布的 100 条引物进行筛选，筛选出条带清晰的引物。

2.4 PCR 扩增与电泳检测

用筛选出的引物对样本进行 PCR 扩增，扩增产物进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$ ，电压 120 V ，电泳 40 min ，取出控干水份后在凝胶成像系统中拍照并保存。

2.5 数据分析

根据电泳结果对条带进行赋值，有条带的记为“1”，无条带或模糊不清的记为“0”，在 Excel 中

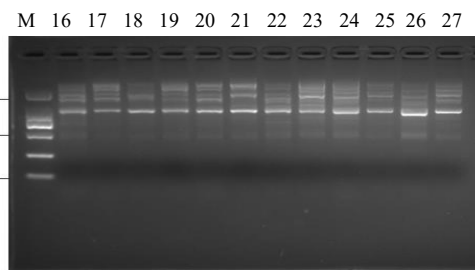
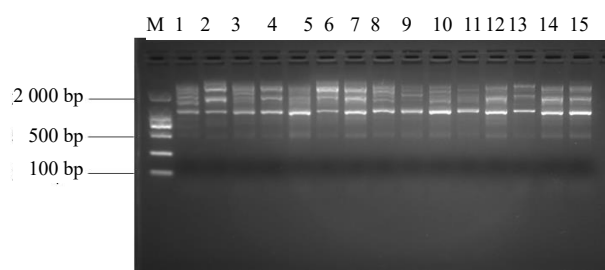
建立 $(0, 1)$ 矩阵。通过遗传多样性分析软件 Popgen 32 对其进行多样性指标的计算，如多态性条带比率（percentage of polymorphic loci, PPB）、Shannon's 指数（Shannon's information index, I ）、Nei's 基因多样性指数（Nei's gene diversity index, h ）、观察等位基因数（number of alleles, N_a ）和有效等位基因数（effective number of alleles, N_e ）。采用分子生物学分析软件 NTSYSpc.2.10e 计算相似系数和遗传距离，并生成树状聚类图。

3 结果与分析

3.1 引物的筛选与多态性分析

以 ISSR-PCR 反应体系对 100 条引物进行筛选，根据条带的清晰度、重复性和多态性的标准，筛选出了 5 条具有良好性能的 ISSR 引物，分别为 UBC811、UBC815、UBC824、UBC834、UBC835。部分电泳图结果如下（图 1、2）。

通过观察这几条引物的条带数发现，扩增条带数在 $38\sim 54$ ，其中，UBC815 产生的条带最少，为 38 条，UBC834 产生的条带最多，为 54 条；共扩增出 245 个位点，其中有 218 个多态性位点，多态性百分率为 89.41% ，UBC824 的多态性百分率最低，为 47.06% ，其余多态性百分率均为 100.00% （表 2）。



M-Marker，编号 1~27 为样品，下图同。

M-Marker, 1—27 are samples numbers, same as below.

图 1 UBC824 引物电泳图

Fig. 1 Electropherogram of UBC824 primers

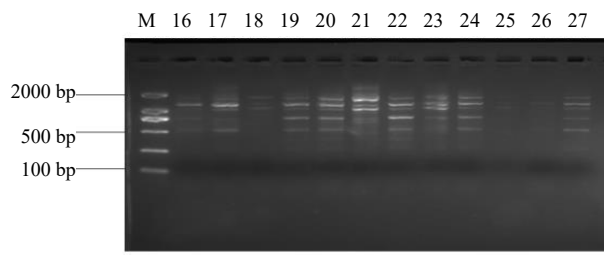
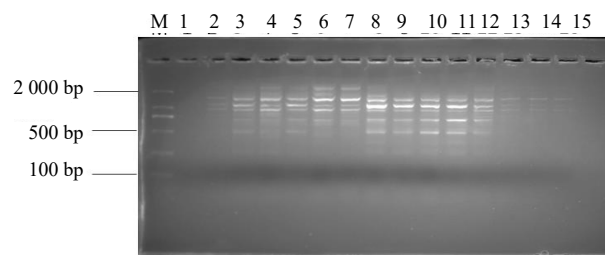


图 2 UBC835 引物电泳图

Fig. 2 Electropherogram of UBC835 primers

表 2 金莲花引物多态性位点
Table 2 *T. chinensis* primer polymorphic sites

引物	碱基序列 (5'-3')	位点数	多态性位点数	多态性百分率/%
UBC811	gAgAgAgAgAgAgAC	52	52	100.00
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTg	38	38	100.00
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCg	51	24	47.06
UBC834	AgAgAgAgAgAgAgYT	54	54	100.00
UBC835	AgAgAgAgAgAgAgYC	50	50	100.00
总计		245	218	89.41

3.2 遗传多样性分析

利用 Popgen 32 软件对 27 份样本进行遗传多样性分析, 其中 N_a 反映变异的种类数量, N_e 反映等位基因频率分布的均衡程度, 结果显示, N_a 在 1.67~2.00, 平均值是 1.93, 其中 UBC824 为 1.67, 而其他引物的 N_a 均为 2.00; N_e 的范围为 1.531~1.682, 均值是 1.600, 其中 UBC834 最高, 为 1.682, UBC835 其次, 为 1.644, UBC815 最低, 为 1.531; h 和 I 能反映物种的遗传多样性水平, 其中 h 在 0.300~0.380, 均值为 0.345; I 在 0.428~0.558, 均值为 0.511, 其中 UBC834 的指数最高, 为 0.558, UBC824 的指数最低, 为 0.428 (表 3)。

表 3 金莲花居群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *T. chinensis* populations

引物	N_a	N_e	h	I
UBC811	2.00	1.595	0.350	0.526
UBC815	2.00	1.531	0.325	0.494
UBC824	1.67	1.550	0.300	0.428
UBC834	2.00	1.682	0.380	0.558
UBC835	2.00	1.644	0.369	0.548
平均值	1.93	1.600	0.345	0.511

3.3 遗传距离与聚类分析

利用 NTSYSpc-2.10e 软件进行遗传相似系数和遗传距离的计算, 运用类平均法 (UPGMA) 对金莲花样本进行聚类分析 (图 3)。当遗传相似系数达到 0.37 时, 金莲花样本可以分为 2 大类, 第一大类

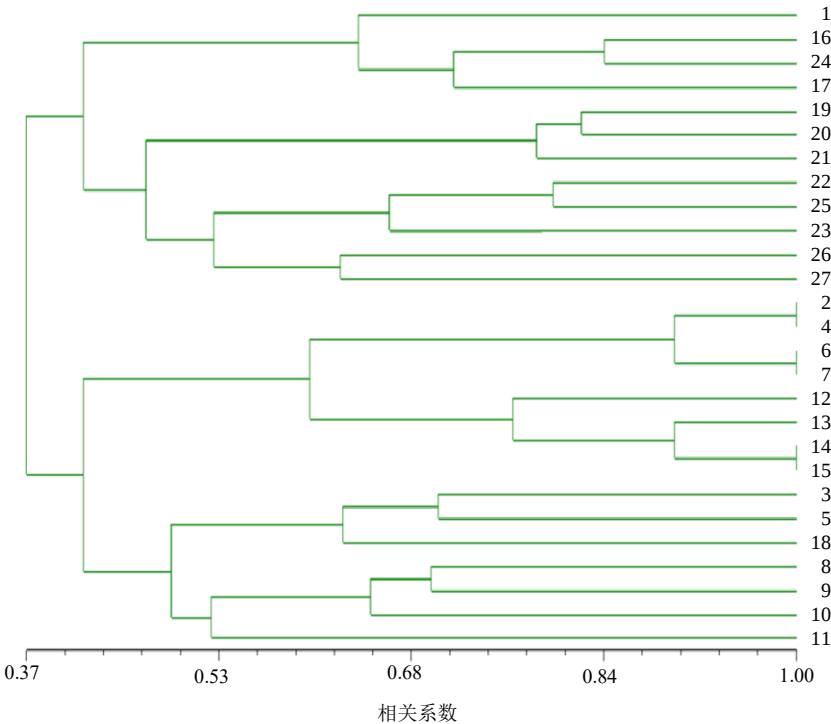


图 3 不同产地金莲花聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis results of *T. chinensis* from different origins

又分为 2 个亚类,第 1 个亚类有内蒙古呼伦贝尔市(1)、内蒙古通辽市(16)、内蒙古呼和浩特市(24)、黑龙江省大兴安岭地区(17);第 2 个亚类有山西省忻州市五台县(19)、河北省承德市(20)、河北省承德市围场县(21)、内蒙古包头市(22)、吉林省通化市(25)、山西省忻州市五台县(23)、河南省焦作市(26)、黑龙江省大兴安岭地区(27);第 2 类也分为 2 个亚类,第 1 个亚类有河北省承德市围场县(2)、河北省承德市围场县(4)、河北省承德市双滦区宜家旺(6)、山西省忻州市五台县石咀村(7)、内蒙古呼伦贝尔市(12)、内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗(13)、内蒙古赤峰市(14)、河北省承德市围场县(15),第 2 个亚类有内蒙古乌海市(3)、内蒙古(5)、河北省承德市围场县(18)、河南(8)、内蒙古呼伦贝尔市根河市(9)、内蒙古赤峰市(10)、内蒙古呼和浩特市(11)。

4 讨论

遗传多样性评价对于种质资源的合理保护至关重要^[11],植物遗传多样性研究及种群鉴定的主要采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphism DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、SSR 和 ISSR 等分子标记技术^[12],ISSR 分子标记因其操作简单^[13]、稳定性好^[14]、灵敏度高^[15]、数据可靠^[16]、反应条件要求低^[17]等特点而脱颖而出,但是关于金莲花遗传多样性的研究甚少,崔欣萍等^[18]建立了一种基于 ITS2 序列的 DNA 条形码鉴定方法,可以有效鉴别金莲花,而本文则是通过 ISSR 分子标记技术分析不同产地金莲花的遗传多样性。

遗传多样性能够体现一个群体内不同个体的遗传变异总和^[19],本实验通过 ISSR 分子标记获得了 218 个多态性位点,多态性位点百分率高达 89.41%,表明 ISSR 分子标记可以应用于金莲花种质资源的遗传多样性研究; N_a 和 N_e 的差异显示部分等位基因频率较高; h 和 I 可以反应物种的遗传多样性水平,其中 $h(I) > 0.5$ 为高遗传多样性, $h(I) = 0.3 \sim 0.5$ 为中等遗传多样性, $h(I) < 0.3$ 为低遗传多样性; h 在 0.300~0.380,均值为 0.345,表明金莲花属于中等偏低遗传多样性水平, I 在 0.428~0.558,均值为 0.511,应该是表明金莲花属于中等至中高水平,与 h 数据存在矛盾,可能是因

为位点间异质性。综合数据分析金莲花种质资源的遗传多样性处于中等水平。通过聚类分析将样品进行分组,结果分为 2 大类,2 大类产地没有明显的地区特征,推测为人工引种导致。

综上,本研究所收集不同产地市场流通的金莲花,均为金莲花种属,物种已变的单一,并且数据显示金莲花的遗传多样性水平为中等,长期栽培导致遗传基础狭窄,较高水平的遗传多样性是物种提高环境适应能力,保证长期生息繁衍的基础^[20],这种现象对于这一种质资源的长期繁衍是很不利的,建议对其进行合理保护以及引入其他类别种质,不仅有助于金莲花提高环境适应能力,对以后金莲花的优良种质资源的筛选具有重要的参考价值,并可以为金莲花的广泛种植提供科学依据。

本实验选取样本涵盖河北、东北、内蒙古及山西等地区,未来研究方向可以考虑通过扩大样本量并结合其环境因素等更深入、全面的研究金莲花的遗传多样性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 243.
- [2] 程瑛,牛志波. 金莲花人工栽培技术 [J]. 河北林业, 2023(1): 32-33.
- [3] 清·赵学敏. 本草纲目拾遗: 十卷 [M]. 影印本. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 39.
- [4] 孙萍,李新朋,薛涛,等. 金莲花药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2022, 33(4): 507-512.
- [5] 蔡红业,吴谨,王雪莲,等. 金莲花的本草考证 [J]. 中国药房, 2023, 34(21): 2678-2683.
- [6] 雷蓉,冯丽,刘永利,等. 金莲花的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 38(5): 1085-1091.
- [7] 孙慧娟,齐研,于栋华,等. 不同产地金莲花种质评价及物质形成机制研究 [J]. 种子, 2024, 43(2): 18-29.
- [8] 刘晓轩,陈思雅,蔡煜涵,等. 基于文献计量学的中药 DNA 条形码研究态势分析 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5201-5211.
- [9] 唐志康,钟秀美,杨雯,等. 梅花花色与黄酮类成分相关性及其 ISSR 种质资源遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3457-3468.
- [10] 包金花,杨恒山,庄得凤,等. 金莲花 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(1): 202-209.
- [11] 陈孝赏,汤紫依,何海叶,等. 基于 ISSR 标记的姜种质资源遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(20): 6757-6766.

- [12] 徐春波, 王勇, 赵来喜, 等. 我国牧草种质资源重要性状分子标记研究进展 [J]. 生物技术通报, 2013, 29(10): 18-23.
- [13] 沈玉英, 丁夏君, 高志红, 等. 基于表型性状数量分类的梅品种遗传多样性分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(5): 802-807.
- [14] 林文磊. 高儿茶素茶树种质资源的 RAPD 分析及特异片段的克隆 [D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [15] Li J S, Wu L Y, Zhang H, *et al.* PCR-RFLP for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with resistance to phenamacril [J]. *Plant Dis*, 2021, 105(4): 889-895.
- [16] 高章会, 华蓉, 孙达锋, 等. 基于灰树花基因组的 SSR 分子标记开发 [J]. 食用菌学报, 2024, 31(5): 27-36.
- [17] 朱专为. 甘蔗栽培品种的主要农艺性状与 AFLP 和 SSR 分子标记的关联分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2018.
- [18] 崔欣萍, 冯佳卉, 赵春颖, 等. 基于 ITS2 的中药材金莲花 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 承德医学院学报, 2019, 36(6): 519-521.
- [19] 李刘敏, 王雪颖, 沈孝鑫, 等. 基于 ISSR 分子标记的青梅品种群遗传多样性分析 [J]. 森林与环境学报, 2025, 45(2): 203-211.
- [20] Luan F S, Delannay I, Staub J E. Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns [J]. *Euphytica*, 2008, 164(2): 445-461.

[责任编辑 时圣明]