

## 江西省锐尖山香圆亲缘关系与群体结构的ISSR分析

王晓云<sup>1</sup>, 张莲<sup>1</sup>, 曹岚<sup>1</sup>, 梁芳<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 豫章师范学院, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**利用简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)分子标记技术对江西省锐尖山香圆进行亲缘关系和遗传结构分析,为该药材资源的保护和利用提供理论依据。**方法:**采集江西省4个县6个采样地的22份锐尖山香圆叶片样本,利用试剂盒法提取基因组DNA。利用64条通用ISSR分子标记引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,运用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)方法检测条带。选择NTsys 2.10e软件,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)计算遗传相似系数并聚类分析。利用Structure 2.1软件分析群体遗传结构。**结果:**有48条ISSR引物扩增后获得了产物,多态性条带百分率处于45.45%~100%。UPGMA聚类分析表明4个县的锐尖山香圆资源不能按照行政区域划分分别聚为一类,群体遗传结构分析表明22份锐尖山香圆群体可以划分为3个类群。**结论:**江西省锐尖山香圆群体间存在着基因交流,会影响该药材不同地理来源种质资源的遗传结构组成。

**[关键词]** 锐尖山香圆;简单序列重复区间扩增多态性(ISSR);分子标记;亲缘关系;群体遗传结构;聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE);非加权配对算术平均法(UPGMA)

**[中图分类号]** R22;R931;R282;C37;Q2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0150-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201046

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200202.1311.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-2-2 13:45

### ISSR Analysis of Genetic Relationship and Population Structure of *Turpinia arguta* Fresh Leaves in Jiangxi Province

WANG Xiao-yun<sup>1</sup>, ZHANG Lian<sup>1</sup>, CAO Lan<sup>1</sup>, LIANG Fang<sup>2\*</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Yuzhang Normal University, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore genetic relationship and population structure of *Turpinia arguta* in six locations of Jiangxi province by inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular marker technique, and to provide theoretical basis for the protection and utilization of this medicinal material resource. **Method:** A total of 22 samples from six locations in four counties in Jiangxi province were collected, and genomic DNA was extracted by kit method. Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using sixty-four universal ISSR molecular marker primers, and the products were detected with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). NTsys 2.10e software was selected to calculate the genetic similarity coefficient by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and cluster analysis. Population genetic structure was analyzed by Structure 2.1 software. **Result:** A total of forty-eight ISSR primers were amplified to obtain the product, the percent of polymorphic bands ranged from 45.45% to 100%. UPGMA cluster analysis showed that these plant individuals could not be clustered according to their respective executive locations. Analysis of population genetic structure showed that 22 samples of *T. arguta* could be divided into three

**[收稿日期]** 20191127(015)

**[基金项目]** 江西省教育厅科学技术研究项目(151323);江西省“双一流”学科建设项目(JXSYLXK-ZHYA0028)

**[第一作者]** 王晓云,博士,副教授,从事分子生药学研究,E-mail:wxy20052002@aliyun.com

**[通信作者]** \*梁芳,教授,从事生物学研究,E-mail:673785642@qq.com

populations. **Conclusion:** There is gene exchange among the populations of *T. arguta* in Jiangxi province, and it can affect the genetic structure of germplasm resources from different geographical sources.

**[Key words]** *Turpinia arguta*; inter-simple sequence repeat (ISSR); molecular marker; genetic relationship; population genetic structure; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE); unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)

锐尖山香圆为省沽油科山香圆属落叶灌木,又名五寸铁树、尖树和黄柿<sup>[1]</sup>,生于海拔600 m以下沟谷常绿阔叶林林缘或灌丛中<sup>[2]</sup>,分布于江西省、福建省、湖南省、广东省、广西壮族自治区、四川省和贵州省等地。该药材为江西省南部地区民间草药,习称“蛾子药”,根和叶均可入药,其干燥叶为山香圆叶含片、山香圆片和山香圆颗粒等中成药的主要原料。据报道,锐尖山香圆叶的主要成分为黄酮碳苷异荛草素等黄酮类化合物<sup>[3-4]</sup>,还含有齐墩果烷和熊果烷型三萜化合物,以及单萜吡啶生物碱<sup>[5-6]</sup>,具有清热祛湿、活血散瘀、消肿止痛的功效<sup>[2]</sup>,用于治疗咽喉炎、扁桃体炎等<sup>[7]</sup>。

简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)分子标记已被广泛用于药用植物群体遗传多样性和遗传结构评估<sup>[8-10]</sup>、种间亲缘关系研究<sup>[11]</sup>、分子鉴别<sup>[12]</sup>、不同染色体倍性种质的遗传差异分析<sup>[13-14]</sup>、遗传稳定性研究<sup>[15]</sup>和遗传图谱构建<sup>[16]</sup>等方面。目前,国内外关于锐尖山香圆的研究较少,且未见遗传背景和群体遗传学方面的研究报道。本实验拟利用ISSR分子标记技术对江西省4个县6个采样地的22份锐尖山香圆进行亲缘关系聚类分析,并研究其群体结构,为该药材的种质资源保护、品种选育和资源利用提供参考。

## 1 材料与方

**1.1 植物材料** 从江西省4个县6个采样地采集22份锐尖山香圆的新鲜叶片,立即加入硅胶干燥后备用,见表1。所有叶片(结合原植物图片)经江西中医药大学药学院赖学文副教授鉴定为省沽油科植物锐尖山香圆 *Turpinia arguta* 的叶片。

**1.2 试剂及仪器** 高效植物基因组DNA提取试剂盒(目录号DP305), $2\times$ Taq聚合酶链式反应(PCR) MasterMix(目录号KT201)和D2000 DNA Marker(目录号MD114)均购自天根生化科技(北京)有限公司;64条简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表2。C1000 Touch™型PCR扩增仪和Gel Doc™ XR+凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司),JY-SCZF型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司)。

表1 江西省锐尖山香圆样品的采集信息

Table 1 Collection information of *Turpinia arguta* in Jiangxi province

编号	样品来源	采样地
1~5	人工品种选育	安远县江西山香药业有限公司山香圆种植基地
6~8	野生人工驯化	安远县江西山香药业有限公司山香圆种植基地
9~10	野生	安远县江西山香药业有限公司山香圆种植基地
11~16	野生	永新县碧波崖风景区
17~18	野生	永新县烟阁乡
19	野生	永新县龙源口镇
20~21	野生	寻乌县三标乡
22	野生	泰和县碧溪镇

**1.3 DNA提取和PCR扩增** 利用高效植物基因组DNA提取试剂盒从锐尖山香圆叶片中提取基因组DNA。PCR扩增体系为15  $\mu$ L,包括引物0.6  $\mu$ L, $2\times$ Taq PCR MasterMix 7.5  $\mu$ L,模板3  $\mu$ L,加超纯水补足。PCR扩增程序<sup>[7]</sup>为94  $^{\circ}$ C预变性5 min;94  $^{\circ}$ C变性45 s,退火1 min,72  $^{\circ}$ C延伸1.5 min,共35个循环;最后72  $^{\circ}$ C延伸7 min。不同引物的退火温度见表2。用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测扩增产物,电泳结束后采用银染法进行染色。

**1.4 数据分析** 对4个县22份锐尖山香圆的ISSR分子标记扩增结果进行统计。在PAGE图上,相同迁移位置上有条带记为“1”,无条带记为“0”,忽略杂带和弱带。根据稳定且易于区分的目的条带,统计多态性条带数目和比率。利用NTsys 2.10e软件计算遗传相似系数并聚类。选择软件的简单匹配(simple matching, SM)系数和SAHN聚类模块进行非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类分析,然后进行随机置换检验(random permutation test)1 000次,再进行矩阵相关关系检验(mantel test)。利用Structure 2.1软件对4个县锐尖山香圆群体进行遗传结构分析,ancestry models选择 admixture model, allele frequency model选择 correlated allele frequencies model。在Structure Harvester网站上(<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)计算获得最佳K值(即群体个数),将确定的最佳K值进行15次重复运算,结果输入Clumpp 1.1.2软件

表 2 ISSR 引物信息

Table 2 Information of ISSR primers

引物	序列(5'→3')	退火温度/°C	引物	序列(5'→3')	退火温度/°C
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	56.0	UBC848	CACACACACACACARG	56.0
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	58.2	UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	53.8
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	51.2	UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	51.0
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	55.3	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT	50.0
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTT	55.3	UBC854	TCTCTCTCTCTCTCRG	50.2
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	51.4	UBC855	ACACACACACACACACYT	53.8
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	56.9	UBC856	ACACACACACACACACYA	59.7
UBC816	CACACACACACACAT	48.0	UBC857	ACACACACACACACACYG	56.0
UBC817	CACACACACACACAA	48.5	UBC858	TGTGTGTGTGTGTGRT	65.7
UBC818	CACACACACACACAG	52.3	UBC859	TGTGTGTGTGTGTGRC	50.7
UBC819	GTGTGTGTGTGTGTGA	54.4	UBC860	TGTGTGTGTGTGTGRA	65.7
UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	52.4	UBC861	ACCACCACCACCACC	55.0
UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	49.3	UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	67.6
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	48.0	UBC863	AGTAGTAGTAGTAGTAGT	51.9
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	57.0	UBC864	ATGATGATGATGATGATG	55.2
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCG	53.8	UBC865	CCGCCGCCGCCGCCGCCG	70.0
UBC825	ACACACACACACACT	59.7	UBC866	CTCTCTCTCTCTCTCTC	52.0
UBC826	ACACACACACACACC	58.8	UBC867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	81.8
UBC827	ACACACACACACACG	60.3	UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	56.0
UBC828	TGTGTGTGTGTGTGTA	57.0	UBC869	GTTGTTGTTGTTGTTGTT	57.9
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGTC	58.5	UBC870	TGCTGCTGCTGCTGCTGC	52.0
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG	48.5	UBC871	TATTATTATTATTATTAT	38.1
UBC831	ATATATATATATATATYA	31.0	UBC872	GATAGATAGATAGATA	40.9
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	51.7	UBC873	GACAGACAGACAGACA	53.5
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGGYA	55.4	UBC874	CCCTCCCTCCCTCCCT	58.0
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	58.0	UBC875	CTAGCTAGCTAGCTAG	52.8
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	50.0	UBC876	GATAGATAGACAGACA	41.0
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTRA	47.5	UBC877	TGCATGCATGCATGCA	62.8
UBC844	CTCTCTCTCTCTCTRC	53.3	UBC878	GGATGGATGGATGGAT	43.0
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	58.0	UBC879	CTTCACTTCACTTCA	44.0
UBC846	CACACACACACACART	52.5	UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	54.4
UBC847	CACACACACACACARC	51.0	UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG	56.0

注:A.腺嘌呤;G.鸟嘌呤;C.胞嘧啶;T.胸腺嘧啶。R=A或G,Y=C或T。

中进行重复抽样,然后使用 Distruct 1.1 软件绘制柱状图。

## 2 结果与分析

**2.1 扩增产物的多态性** 64 条引物共扩增出 933 个条带,其中多态性条带 804 条。在各引物的扩增产物中,多态性条带百分率 45.45%~100%。有 19 条引物,扩出来的条带均为多态性条带,即多态性条带百分率达 100%;有 16 条引物扩增后未检测到条

带,见表 3 和图 1。

**2.2 UPGMA 聚类分析** 对 4 个县 22 份锐尖山香圆单株进行聚类分析。结果遗传相似系数处于 0.608~0.957,平均值 0.749。矩阵相关关系检验的相关系数 0.791 52( $P=0.002$ ),说明聚类树对原始距离矩阵的代表程度高。4 个县的单株不能按照行政区划各自聚成单独的一支,而是存在着遗传物质的交流,见图 2。

表3 ISSR引物的扩增产物条带检测

Table 3 Detection of bands in amplified products of ISSR primers

引物	扩增条带数 /条	多态性条带数 /条	多态性条带率 /%	引物	扩增条带数 /条	多态性条带数 /条	多态性条带率 /%
UBC809	22	10	45.45	UBC848	28	24	85.71
UBC810	0	0	-	UBC849	22	19	86.36
UBC811	28	16	57.14	UBC850	18	18	100.00
UBC812	26	16	61.54	UBC853	13	13	100.00
UBC813	14	13	92.86	UBC854	16	16	100.00
UBC814	9	8	88.89	UBC855	19	18	94.74
UBC815	0	0	-	UBC856	24	22	91.67
UBC816	19	14	73.68	UBC857	25	25	100.00
UBC817	13	11	84.62	UBC858	0	0	-
UBC818	22	16	72.73	UBC859	20	20	100.00
UBC819	14	10	71.43	UBC860	0	0	-
UBC820	13	11	84.62	UBC861	20	20	100.00
UBC821	11	9	81.82	UBC862	23	23	100.00
UBC822	12	9	75.00	UBC863	16	10	62.50
UBC823	0	0	-	UBC864	0	0	-
UBC824	0	0	-	UBC865	20	20	100.00
UBC825	17	16	94.12	UBC866	23	23	100.00
UBC826	21	16	76.19	UBC867	26	26	100.00
UBC827	22	17	77.27	UBC868	0	0	-
UBC828	18	14	77.78	UBC869	16	16	100.00
UBC829	22	19	86.36	UBC870	19	19	100.00
UBC830	20	13	65.00	UBC871	0	0	-
UBC831	0	0	-	UBC872	0	0	-
UBC835	21	17	80.95	UBC873	41	41	100.00
UBC836	19	17	89.47	UBC874	16	16	100.00
UBC841	15	15	100.00	UBC875	0	0	-
UBC842	20	19	95.00	UBC876	18	18	100.00
UBC843	13	12	92.31	UBC877	0	0	-
UBC844	16	16	100.00	UBC878	20	20	100.00
UBC845	0	0	-	UBC879	0	0	-
UBC846	26	24	92.31	UBC880	0	0	-
UBC847	19	17	89.47	UBC881	18	18	100.00

2.3 遗传结构分析 对4个县的22份锐尖山香圆进行群体遗传结构分析,结果发现当 $K=3$ 时, $\Delta K$ 达到峰值,确定 $K=3$ 是最佳的划分,表明所研究的锐尖山香圆群体可以划分为3个类群,即遗传物质来源于3个类群,见图3,分别由红色、蓝色和蓝紫色表示。不同颜色表示不同的“血统”,或者说,来自于不同的祖先群体。安远县有4个单株来源于单一的类群;其中,2个单株来源于红色类群,另外2个单株

来源于蓝紫色类群。永新县有2个单株来源于单一的类群;其中,1个单株来源于蓝紫色类群,另外1个单株来源于绿色类群。寻乌县有1个单株来源于单一的绿色类群。其他单株均检测到不同程度的“血统”杂合现象。安远县江西山香药业有限公司山香圆种植基地的10个锐尖山香圆单株,遗传物质主要来源于红色和蓝紫色类群。总体来看,在22份锐尖山香圆中,少数单株含有纯正的血统,但是大部分

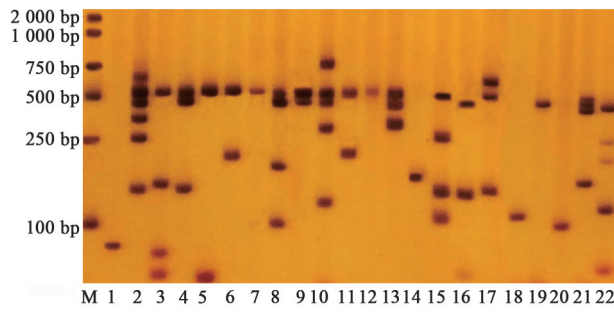
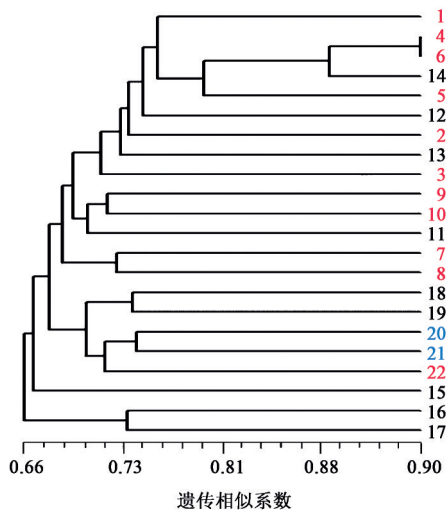


图1 ISSR引物在锐尖山香圆群体中扩增的PAGE(以引物UBC859为例)

Fig. 1 PAGE analysis of ISSR primers amplified in populations of *Turpinia arguta* fresh leaves (taking primer UBC859 as an example)



1~22. 锐尖山香圆单株编号;来源于同一县的单株数字编号颜色相同

图2 江西省4个县锐尖山香圆的UPGMA聚类分析  
Fig. 2 UPGMA cluster analysis of *Turpinia arguta* from four counties in Jiangxi province

单株含有其他类群的遗传成分。表明不同地理来源的群体间存在基因交流,与聚类分析结果基本一致。



图3 江西省4个县的锐尖山香圆资源的遗传结构分析(K=3)  
Fig. 3 Genetic structure analysis of *Turpinia arguta* from four counties in Jiangxi province (K=3)

### 3 讨论

山香圆属植物约30种,分布于亚洲和美洲的热带地区,我国约有13种。该属植物具有抗炎、抗菌、

镇痛和调节免疫等作用,可清热解毒、消肿止痛,临床上用于治疗炎症,还可用于治疗毒蛇咬伤,且疗效较好<sup>[17]</sup>。目前,人们对于天然药物的关注度不断增强,从山香圆属植物中挖掘活性成分是研究的一个重要方向。但国内外对锐尖山香圆资源的研究较少,仅见其化学成分分析的报道。

江西省是山香圆叶的主产区,随着近年来大规模的人工采摘,野生锐尖山香圆资源蕴藏量和自然更新能力明显下降。江西省第四次中药资源普查表明,锐尖山香圆在江西省的分布除上饶市、景德镇市、九江市的部分县区外,均有分布,但以吉安市永新县和泰和县、赣州市安远县和龙南县等地资源丰富。为了实现资源的可持续利用,部分种植基地开始进行引种和品种选育工作。安远县林业局和江西山香药业有限公司于2007年开始进行锐尖山香圆的人工繁育与种植技术研究,并在安远县建立了种源基地和种植基地。刘地发等<sup>[18]</sup>对来源于全国10个不同产地的山香圆叶药材中女贞苷、野漆树苷的含量进行了测定和比较,结果表明江西省5个产地的药材质量优于其他省份,安远县人工种植的山香圆质量优于野生种。

本研究利用64条ISSR引物对江西省4个县的22份锐尖山香圆资源进行了聚类分析,并研究了其群体遗传结构。结果发现64条ISSR引物在锐尖山香圆群体中的扩增表现不同。有16条引物扩增后未检测到条带;48条ISSR引物有扩增产物,但产物中多态性条带百分率差别较大。其中,多态性条带百分率高的引物,可以用于其他锐尖山香圆种质资源的研究,以提高检测效率。4个县的锐尖山香圆遗传物质来源可以划分为3个类群,各采样地的锐尖山香圆群体间存在着基因交流。国内外尚未见锐尖山香圆群体遗传背景和遗传结构的研究报道,本研究结果可为该药材的资源保护、品种选育和开发利用提供科学依据。对于遗传交流和群体结构如何影响锐尖山香圆药材质量,尚需今后通过药材质量分析进行深入研究。

### [参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志:卷46 [M]. 北京:科学出版社,1981:27.  
[2] 《江西植物志》编辑委员会. 江西植物志:三卷[M]. 南昌:江西科学技术出版社,2014:401-402.  
[3] 吴敏. 华南龙胆和山香圆的化学成分研究[D]. 北京:中国科学院大学,2010.  
[4] MA S G, YUAN S P, LIU Y B, et al. 3-Hydroxy-3-

- methylglutaryl flavone glycosides from the leaves of *Turpinia arguta*[J]. *Fitoterapia*, 2018, 124: 80-85.
- [ 5 ] WU M, WU P, XIE H, et al. Monoterpenoidindole alkaloids mediating DNA strand scission from *Turpinia arguta*[J]. *Planta Med*, 2011, 77(3): 284-286.
- [ 6 ] 吴敏, 赵广才, 魏孝义. 锐尖山香圆叶中三萜类成分的研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 78-83.
- [ 7 ] 李云秋. 爪瓣山柑及锐尖山香圆叶化学成分的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [ 8 ] 曹玲亚, 谷聪, 孙海峰, 等. 基于SSR标记的党参属部分药用植物的遗传多样性和遗传结构评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 45-52.
- [ 9 ] 徐惠龙, 汪英俊, 陈鸣, 等. 基于ISSR标记的福建省多花黄精与长梗黄精种质鉴别及遗传多样性分析[J]. *福建农业学报*, 2017, 32(6): 619-624.
- [ 10 ] 刘翔, 付长珍, 高敏, 等. 基于ISSR技术和非腺毛特征研究柔毛淫羊藿和近缘种遗传关系和居群遗传多样性[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(16): 3090-3097.
- [ 11 ] 关萍, 刘鑫, 彭昌琴, 等. 11个淫羊藿属植物的ITS和ISSR亲缘关系分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(6): 1958-1964.
- [ 12 ] 郑茜, 杨倩, 陈永钧, 等. 基于ISSR及SCoT分子标记对射干、川射干药材的分子鉴别[J]. *中国药学杂志*, 2018, 53(13): 1063-1069.
- [ 13 ] 韦荣昌, 李虹, 蒋建刚, 等. 多倍体无籽罗汉果及其亲本遗传背景的ISSR分析[J]. *园艺学报*, 2012, 39(2): 387-394.
- [ 14 ] 柴俊雯, 刘玉, 陈红刚, 等. 四倍体黄芩及二倍体黄芩遗传差异的ISSR分析[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(5): 665-669.
- [ 15 ] 高素芳, 陈红刚, 张延红, 等. 利用ISSR-PCR研究麻花秦艽超低温再生植株遗传稳定性[J]. *中药材*, 2015, 38(6): 1123-1125.
- [ 16 ] 宗成堃, 宋振巧, 陈海梅, 等. 利用SSR、SRAP和ISSR分子标记构建首张丹参遗传连锁图谱[J]. *药学报*, 2015, 50(3): 360-366.
- [ 17 ] 赵洁, 姚默, 刘向辉, 等. 山香圆属药学研究综述[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(11): 6435-6436, 6438.
- [ 18 ] 刘地发, 李志勇, 程帆, 等. 不同产地山香圆叶药材的质量评价[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(2): 476-477.

[责任编辑 刘德文]