

牻牛儿苗种质资源遗传多样性的 ISSR 研究

郝东,尹海波*,赵晓雨,杨小乐

(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**研究牻牛儿苗亲缘关系和遗传多样性。**方法:**23 个样品进行简单序列重复区间 (ISSR) 分析,利用 NTSYS 软件计算材料间遗传相似系数,并用 UPGMA 方法聚类,构建亲缘关系系统图。**结果:**从 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条多态性明显、反应稳定的引物,在 23 份供试材料 DNA 中共扩增出 185 条谱带,其中多态性条带 142 条,占 76.8%。材料间 ISSR 标记遗传相似性系数 (GS) 在 0.458 ~ 0.916。聚类分析结果显示,所有供试材料均可区分开,并聚为 6 组。**结论:**分子标记研究结果与牻牛儿苗的地理位置、形态性状存在显著的相关性,较好地揭示了牻牛儿苗种源间的遗传关系,可为牻牛儿苗资源划分和良种选育提供科学依据。

[关键词] 种源; 牻牛儿苗; 简单序列重复区间; 遗传关系

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0147-04

[doi] 10.11653/syjf2013150147

Genetic Diversity of *Erodium stephanianum* Based on ISSR Analysis

HAO Dong, YIN Hai-bo*, ZHAO Xiao-yu, YANG Xiao-le

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** This article assessed the genetic relationship and genetic diversity in *Erodium stephanianum*. **Method:** Twenty-three germplasmic resources of *E. Stephanianum*. were analyzed by inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Genetic similarities were calculated by using NTSYS software and the dendrogram was constructed by using UPGMA method. **Result:** Fourteen ISSR primers were selected from 100 ISSR primers, and 185 DNA fragments were amplified from 23 samples. Of which, 142 fragment were polymorphic (percentage of polymorphic bands was 76.8%). The genetic similarity among all accessions ranged from 0.458 to 0.916. Clustering analysis showed that the 23 samples of *Fritillaria* could be distinctively classified into 6 groups. **Conclusion:** Results from the cluster analysis were correlated significantly with the morphological characteristics and geographical location of 23 samples. The data indicate that ISSR technique is useful to determine genetic diversity and genetic relationship among *E. stephanianum*. provenances, providing a scientific basis for

[收稿日期] 20120112(002)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A498);杏林青蓝工程杰出青年基金

[第一作者] 郝东,硕士,从事中药品质评价研究,Tel:0411-87586012,E-mail:haodong454@sina.com

[通讯作者] *尹海波,教授,硕士生导师,从事中药资源及药材的品质评价研究,Tel:15998530628,0411-87586003;E-mail:yhb0528@sina.com

- [9] 杨飞,徐延浩. 温度对菘蓝基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(6):113.
- [10] 朱田田,晋玲,杜弢,等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):72.
- [11] 林淑芳,帅凌飞,袁媛,等. 黄芩延长因子 1a 基因全长 cDNA 的克隆及其功能[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):126.
- [12] 武莹,阎玉凝,刘春生. 柴胡 ITS 序列研究、药源调查及商品鉴定[D]. 北京:北京中医药大学,2005.

[责任编辑 邹晓翠]

genetic breeding, differentiation and new cultivar selection.

[Key words] provenances; *Erodium stephanianum*; ISSR; genetic relationship

牻牛儿苗来源于牻牛儿苗科植物牻牛儿苗的干燥地上部分,习称长嘴老鹳草^[1],为商品老鹳草的主要来源^[2]。味辛、苦、平,归肝、肾、脾经,具有祛风除湿,通经活络,清热解毒止痢之功效^[3]。目前经查阅文献可知国内外对牻牛儿苗以及同科属植物的研究主要集中在生药性状鉴别、有效成分的提取分离、含量测定、药理与临床、栽培等方面^[4-7]。前期研究表明不同地理种源的牻牛儿苗有效成分含量不同,但其有效成分的差异是否存在着遗传基础,能否从分子水平上揭示其遗传规律,至今未有报道。因此本研究运用简单序列重复区间 (ISSR) 分析技

术从 DNA 分子水平上分析了不同产地牻牛儿苗的遗传多样性,为合理保护、利用与开发牻牛儿苗遗传资源提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 供试材料采自黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古、河北、北京、天津、山东等主产地,共 23 份材料 (表 1),于 2010 年 7 月-2010 年 8 月收集,由辽宁中医药大学药学院药用植物教研室尹海波教授鉴定为牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd 的干燥地上部分。每个产地均选择当年萌发的幼嫩叶片,变色硅胶快速干燥保存备用。

表 1 牻牛儿苗样品来源信息

No.	产地	生态环境	No.	产地	生态环境	No.	产地	生态环境
1	吉林白城	路边草丛	9	辽宁彰武章	路边草丛	17	河北六里坪	路边草丛
2	吉林通榆边昭镇	路边草丛	10	辽宁熊岳	海边路旁	18	天津蓟县	路边草丛
3	吉林松原市	路边草丛	11	辽宁沈阳	路边草丛	19	内蒙古通辽	路边草丛
4	吉林通榆三家子	路边草丛	12	北京密云	路边草丛	20	内蒙古科尔沁	路边草丛
5	山东潍坊	路边田埂	13	北京延庆	田埂石缝	21	黑龙江泰来县	山坡田埂
6	山东济南	路边草丛	14	北京鹫峰森林公园	河塘路旁	22	黑龙江齐齐哈尔	山坡路旁
7	山东青岛	路边草丛	15	河北易县狼牙山	山坡草丛	23	黑龙江大庆	山坡路旁
8	辽宁大连	路边草丛	16	河北易县清西陵	田埂路旁			

ISSR 引物参考加拿大 UBC 大学提供的引物序列,由北京赛百盛生物工程技术有限公司合成。

1.2 总 DNA 的提取和检测 基因组 DNA 提取选用 CTAB 提取法,其 DNA 浓度和纯度经 NanoDrop 微量分光光度计 (ND-1000) BFQ,并于 1% 的琼脂糖电泳检测,凝胶成像系统 (GelDoc™, Bio-Rad) 观察并照相。

1.3 PCR 引物筛选 引物筛选包括初筛和复筛。利用所提取的基因组 DNA 作为 PCR 反应模板,分别用 1 个模板对 100 个引物进行初筛,从中筛选出 14 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR 分析。

1.4 ISSR-PCR 扩增与检测 PCR 扩增在 BIO-RAD PTC-200 型 PCR 仪上进行。ISSR 反应体系:总体积 25 μL,内含 10 × PCR buffer, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.5 μmol · L⁻¹ 引物, 50 ng 模板, 1 U Taq DNA 聚合酶, ddH₂O 补足 25 μL。

扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 完成最后一个循环后,在 72 °C 保温 7 min, 4 °C 保存。

扩增产物在 2.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离。当溴酚蓝指示剂距离琼脂糖凝胶前沿约 2 ~ 3 cm 时,停止电泳。溴化乙锭染色,凝胶成像仪上观察照相、记录。

1.5 数据统计与分析 同一引物,同一位点,按条带有或无赋值,有带 (显性) 记为 1, 无带 (隐性) 记为 0, 强带和弱带的赋值均为 1, 形成 0, 1 矩阵。用 NTsys2. 10e 软件系统计算材料间遗传相似系数 (GS)。根据 GS 值按不加权重对群算术平均法 (UPGMA) 构建树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物筛选分析 随机用 1 个样品对 100 个引物进行筛选,结果有较多引物都有扩增,每个引物可扩增出 1 ~ 18 个条带不等;再次对条带清晰、主

带明显的初选引物进行筛选,最终确定 14 个引物,反应稳定、扩增性强和重复性好,见表 2。

表 2 引物序列及其扩增结果

引物	序列 5'-3'	总条带数	多肽性带数	多肽比率 /%
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	17	11	64.71
825	ACACACACACACACT	10	9	90.00
827	ACACACACACACACAG	11	8	72.73
834	AGAGAGAGAGAGAGYTT	13	13	100.00
836	AGAGAGAGAGAGAGAYA	16	13	81.25
840	GAGAGAGAGAGAGAYT	15	10	66.67
841	GAGAGAGAGAGAGAYA	18	9	50.00
844	CTCTCTCTCTCTCTRC	13	12	92.31
847	CACACACACACACARC	8	5	62.50
848	CACACACACACACARG	14	12	85.71
855	ACACACACACACACACYT	11	9	81.82
880	GGAGAGGAGAGAGA	12	12	100.00
881	GGGTGGGTGGGGTG	13	10	76.92
894	TGGTAGCTCTTGATCANNNN	14	9	64.29

注:R = A/G, Y = C/T, N = A/G/C/T

2.2 ISSR 多态性分析 从 ISSR 扩增条带统计结果来看,筛选出的 14 个引物共检测到 185 条扩增带,其相对分子质量在 200 ~ 2 000 kb,其中多态性条带 142 条,多态性条带率为 76.8%,不同引物扩增出的清晰条带数在 8 ~ 18,平均每个引物扩增出的片段条数为 13.21 条,扩增的多态性条带数为 5 ~ 13,每个引物的多态性百分率为 50% ~ 100%,平均每个 ISSR 引物扩增出的多态性条带数目为 10.14 条。条带最多的是引物 841,共 18 条;条带最少的是引物 847,共 8 条;多态性最高的是引物 834,880,多态率高达 100%。各扩增图谱中,没有发现明显的物种特征性条带。引物 811 的扩增结果见图 1,引物 894 的扩增结果见图 2。

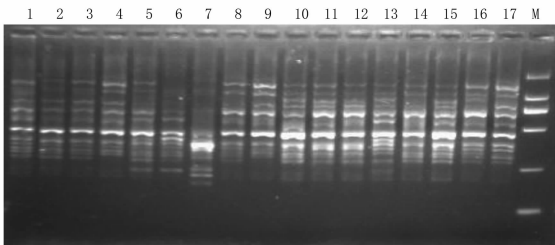


图 1 引物 811 扩增结果(序号 1 ~ 17,同表 1)

2.3 遗传相似系数 本试验收集了不同种质的牦牛儿苗样品,分析各样品间的遗传相似系数,见表

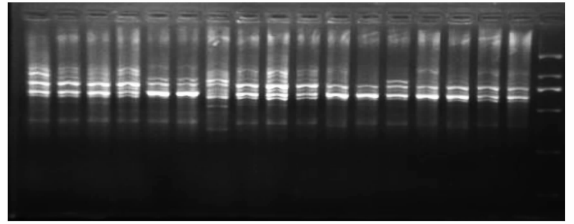


图 2 引物 894 扩增结果(序号 1 ~ 17,同表 1)

3,得到各牦牛儿苗样品的 GS 平均值为 0.687,所有牦牛儿苗样品间的变化范围为 0.423 ~ 0.923,其中 7 号与 8 号样品间的 GS 值最低,为 0.423。12 与 13 号样品之间的 GS 值最高,为 0.923;7 号样品与其他样品的 GS 值在 0.423 ~ 0.500,结果表明与其他样品之间存在较明显的差异现象;其他样品之间的 GS 值在 0.542 ~ 0.923 之间,表明彼此之间具有较丰富的遗传多样性。

2.4 遗传距离聚类分析 利用聚类分析软件 NTsys2.10e 对 ISSR-PCR 扩增所得的多态性位点进行分分析,得到牦牛儿苗 23 个样品的遗传相似矩阵,可划分成 6 大类,见图 3。

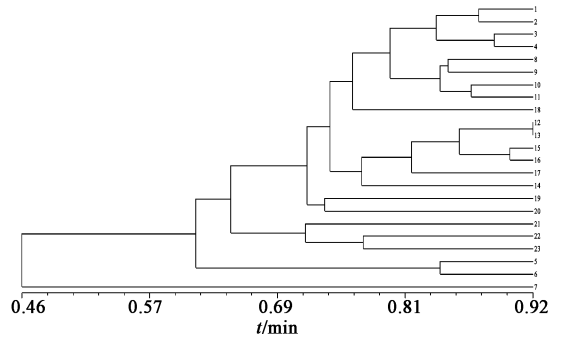


图 3 23 个样品的 ISSR 聚类树状

第一类包括来自吉林、辽宁、天津的 9 个种质,第二类来自河北、北京的 6 个种质,第三类来自内蒙古的 2 个种质,第四类来自黑龙江的 3 个种质,第五类来自山东的 2 个种质,第六类来自山东的 1 个种质。从以上聚类结果可以看出,各种牦牛儿苗种质并不按地理界限严格的聚在一起,如来自天津的样品(17)和地理区位较近北京样品(12,13,20)并未聚在一起,来自于山东青岛的样品(7)和山东潍坊(5)、山东济南(6)的样品也未聚在一起。但还是可以看出,来源于同一地区的部分牦牛儿苗种质聚在同一类,基本呈现出一定的地域性分布规律。如来自吉林的 1,2,3,4 共 4 份牦牛儿苗种质聚成一亚类,来自辽宁的 8,9,10,11 共 4 份牦牛儿苗种质聚为一亚类;来自河北的 14,15,19 共 3 份牦牛儿苗聚

表 3 23 个样品的遗传相似系数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	1.000																						
2	0.8731	1.000																					
3	0.8380	0.8381	1.000																				
4	0.8380	0.8240	0.8871	1.000																			
5	0.6340	0.6340	0.6130	0.6551	1.000																		
6	0.6270	0.5990	0.5770	0.6060	0.8381	1.000																	
7	0.4510	0.4510	0.4440	0.4720	0.4510	0.4441	1.000																
8	0.7750	0.7890	0.7540	0.7680	0.6760	0.6690	0.4231	1.000															
9	0.7460	0.8310	0.7540	0.7820	0.6480	0.5990	0.4370	0.8451	1.000														
10	0.7960	0.8660	0.7750	0.8030	0.6410	0.6340	0.4300	0.8380	0.8521	1.000													
11	0.8310	0.8450	0.7820	0.7820	0.6760	0.6830	0.4370	0.8310	0.8310	0.8661	1.000												
12	0.7540	0.7680	0.6900	0.6900	0.6270	0.5770	0.4440	0.7540	0.7680	0.8030	0.8101	1.000											
13	0.7040	0.7320	0.6690	0.6830	0.6200	0.5560	0.4230	0.6900	0.7180	0.7680	0.7750	0.9231	1.000										
14	0.6970	0.7390	0.6620	0.6760	0.6130	0.5920	0.4720	0.6830	0.7540	0.7610	0.7540	0.7750	0.7391	1.000									
15	0.7680	0.7390	0.7320	0.7460	0.6410	0.5920	0.4720	0.7390	0.7540	0.7750	0.7820	0.8590	0.8100	0.7751	1.000								
16	0.7960	0.7820	0.7460	0.7610	0.5850	0.5630	0.4720	0.7540	0.7960	0.8030	0.8100	0.8870	0.8660	0.7890	0.9011	1.000							
17	0.7180	0.7180	0.6690	0.6970	0.6340	0.5990	0.4510	0.7180	0.7180	0.7540	0.7750	0.8100	0.7890	0.7540	0.8240	0.8241	1.000						
18	0.7540	0.7820	0.7610	0.7610	0.5850	0.5630	0.4860	0.7680	0.7540	0.7460	0.7390	0.7320	0.6830	0.7180	0.7320	0.7320	0.6551	1.000					
19	0.7110	0.7110	0.7040	0.7320	0.6550	0.6340	0.4440	0.7680	0.7250	0.7460	0.7540	0.7040	0.6830	0.7040	0.6900	0.6900	0.7250	0.6901	1.000				
20	0.7390	0.7250	0.7180	0.6900	0.6270	0.6340	0.4580	0.7540	0.7390	0.7040	0.7820	0.7180	0.6970	0.6760	0.7320	0.7320	0.6690	0.6690	0.7321	1.000			
21	0.6270	0.6130	0.6200	0.6200	0.5850	0.5490	0.5000	0.5850	0.6410	0.6340	0.6410	0.5920	0.6130	0.5770	0.5770	0.5770	0.5420	0.6060	0.6340	0.6341	1.000		
22	0.5990	0.6410	0.6060	0.6060	0.6130	0.5920	0.4860	0.6130	0.6270	0.6480	0.6550	0.6060	0.5990	0.6060	0.5920	0.5770	0.5850	0.5770	0.6200	0.6620	0.6761	1.000	
23	0.7460	0.7460	0.7390	0.7250	0.6060	0.5700	0.4790	0.7180	0.7180	0.7390	0.7750	0.7110	0.7040	0.6690	0.7250	0.7110	0.6620	0.7110	0.6970	0.7110	0.7540	0.768	1.000

成一亚类与来自北京的 12,13,20 共 6 份牻牛儿苗聚为一类;来自内蒙古的 18,23 聚为一类;来自黑龙江 16,21,22 聚为一类;来自山东的 5,6 聚为一类。说明牻牛儿苗种质资源根据 ISSR 分子标记划分的类群同地理分布有一定的关系。

3 讨论

在本试验中,供试材料经过适合的引物扩增, DNA 多态性好,条带清晰,且聚类结果可以将大多数样品区分开,可见 ISSR 标记可以用于牻牛儿苗种源的遗传关系研究。从 ISSR 标记扩增结果来看,23 份牻牛儿苗种质的遗传多样性为 76.8%,各种质间遗传相似系数在 0.423~0.923,表明牻牛儿苗各种质间存在比较丰富的遗传多样性。通过聚类分析供试 23 个种源可分为 6 大类,各牻牛儿苗种质并不按地理界限严格的聚在一起,但与地理分布存在一定的相关性。同时通过聚类分析结果可见各牻牛儿苗种质的聚类与生态环境并无直接的联系。

作者在采集样品过程中发现,7 号样品(山东青岛)就其原植物样品表型特征发现,植物形态与其他样品有明显的差异,叶片分裂较其他样品叶片

分裂更加细碎,判断可能是芹叶牻牛儿苗,与其他 22 个种源遗传相似系数均在 0.423~0.500,表现出较远的亲缘关系。聚类分析结果可见自成一类,表明遗传性状与形态特征存在一定的相关性。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:263.
- [2] 陈玉武,李克明,李药兰,等. 牻牛儿苗化学成分研究[J]. 中草药,2007,38(8):1148.
- [3] 雷志勇,刘岱林,胡迎庆,等. 老鹳草的化学成分及药理研究进展[J]. 中药材,2002,25(10):759.
- [4] 周海燕. 老鹳草的研究概况[J]. 国外医药:植物药分册,1996,11(4):164.
- [5] 杜树山,张文生. 毛蕊老鹳草化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):625.
- [6] 木村正康(日),崔征译. 汗方药理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006:218.
- [7] 罗宏,尹海波. HPLC 同时测定鼠掌老鹳草中 5 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):83.

[责任编辑 邹晓翠]