

菊科药用植物遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析

唐小慧^{1,2}, 胡静^{1,2}, 任超翔^{1,2}, 宋婕¹, 裴瑾^{1,2}, 吴清华^{1,2}, 陈江^{1,2*}¹成都中医药大学药学院; ²中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要:本研究采用 ISSR 分子标记对菊科各属种质进行遗传多样性和亲缘关系进行分析,为种质资源的有效保存及分子鉴定奠定基础。采用 ISSR-PCR 扩增国家中药种质资源库保存的菊科 40 个属的 40 份药用植物,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,NTSYS-pc2.1 软件对电泳结果进行多态性分析,UPGMA 构建遗传树。此次实验筛选出 8 条引物,40 份材料扩增出 68 个位点,多态性位点为 68 个,多态性位点百分率为 100%,遗传相似性系数范围在 0.71~0.91。UPGMA 聚类分析结果表明在相似性系数为 0.75 时可将这 40 种菊科药用植物分为 7 类。结果表明目前搜集的 40 个属材料遗传多样性较为丰富,选择的 8 个 ISSR 引物可进一步用于后续种质资源的分子鉴定。

关键词:菊科;ISSR;UPGMA;遗传多样性;分子鉴定

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.018

Analysis of Genetic Diversity and Relationship in Medicinal Plants of Compositae by ISSR

TANG Xiao-hui^{1,2}, Hu Jing^{1,2}, REN Chao-xiang^{1,2}, SONG Jie¹, PEI Jin^{1,2}, WU Qing-hua^{1,2}, CHEN Jiang^{1,2*}

¹Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; ²State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

Abstract: ISSR markers were used to analyze the genetic diversity and genetic relationship of germplasm of Compositae, to preserve and identify Germplasm resources. ISSR-PCR was used to amplify 40 medicinal plants from 40 representative genera of Asteraceae, which were conserved in The State Bank of Chinese Drug Germplasm Resources. PCR products were detected by agarose gel electrophoresis, and the polymorphisms were analyzed by NTSYS-pc2.1. The genetic tree was constructed by UPGMA. In this experiment, 8 primers were screened, 68 loci were amplified from 40 species of Compositae medicinal plants. And the percentage of polymorphic loci was 100%. The genetic similarity coefficient ranged from 0.71 to 0.91. The results of UPGMA cluster analysis showed that the 40 species of compositae medicinal plants could be divided into seven categories at 0.75 similarity coefficient. The 40 genera collected have rich genetic diversity and the 8 ISSR primers can be used for molecular identification of germplasm resources.

Key words: compositae; ISSR; UPGMA; genetic diversity; molecular identification

基于第四次资源普查建立的国家中药种质资源库,至今已收藏了大量的中药种质资源。保存资源数量充足与否,是否对资源进行了有效保存,都迫切需要开展种质资源的遗传多样性和亲缘关系研究。此外,为了保障种质资源信息的准确,有必要开发分子标记进行种质资源的鉴定。菊科植物广布全球,我国有 227 属,2300 余种,其中已知药用 155 属,

778 种^[1]。菊科是被子植物的第一大科,有许多常用的药用植物,如红花、艾蒿、苍术、牛蒡等。

ISSR 分子是在简单重复序列(SSR)基础上发展起来的一种新型标记,结合了其他分子标记多态性高以及技术简单、快速、成本低等优点^[2];同时,ISSR 标记技术由于采用了较长的引物,使得试验结果可重复性提高^[3]。目前已有大量利用 ISSR 分子标记分析种间及属间的遗传多样性的研究,如张春平等^[4]利用 ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性进行了分析;刘君等^[5]利用 ISSR 对 9 中狗牙根进行鉴定分析;姚明哲^[6]利用 ISSR 和 EST-SSR 标记对我国茶树资源的遗传多样性和遗传

收稿日期:2018-02-05 接受日期:2018-04-25

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573544);四川省科技厅项目(2014SZ0156);四川省科技厅项目(2015TD0028);成都中医药大学校基金(ZRYY1610,ZRQN1647)

* 通信作者 Tel:86-013096363851; E-mail:janshen1986@163.com

结构进行了研究。目前分子标记在菊科植物多态性方面亦有诸多研究,如樊晓霞等^[7]对峨眉山的7种药用菊科药用植物用 RAPD 进行了分析。缪恒彬等^[8]应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱的构建,发现 ISSR 标记技术能较好地

从分子水平揭示出菊花品种的遗传多样性,并能有效应用于菊花品种指纹图谱的构建。

本研究选择了国家中药种质资源保存的菊科种质,包括 40 个属的 40 份材料,利用 ISSR 分子标记对其进行多态性及亲缘关系分析。一方面,通过多

态性与亲缘关系远近来评价种质资源的丰富及保存情况,另一方面,通过筛选的 ISSR 标记,对菊科不同属种质材料进行快速简便的分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

本次实验所用材料主要来自成都中医药大学国家中药种质资源库所保存的来自全国各地的菊科种质材料(表 1)。本次实验材料均由成都中医药大学裴瑾教授鉴定为菊科各属的植物。

表 1 样品信息表

Table 1 Materials used in the study

编号 No.	种质名称 Germplasm name	属名 Genus name	编号 No.	种质名称 Germplasm name	属名 Genus name
A1	女苑	女苑属	A21	银背风毛菊	风毛菊属
A2	向日葵丈菊	向日葵属	A22	单麻叶千里光	紫菀属
A3	细叶鸦葱	鸦葱属	A23	草地麻花头	麻花头属
A4	毛连菜	毛连菜属	A24	一枝黄花	一枝黄花属
A5	蓍草	蓍属	A25	刺儿菜	蓟属
A6	火绒草	火绒草属	A26	飞廉	飞廉属
A7	东风菜	东风菜属	A27	秋英	秋英属
A8	秋分草	秋分草属	A28	兔儿伞	兔儿伞属
A9	青海鳶蓟	狷菊属	A29	菊苣	菊苣属
A10	翼齿六棱菊	六棱菊属	A30	祁州漏芦	祁州漏芦属
A11	水飞蓟	水飞蓟属	A31	和尚菜	和尚菜属
A12	山牛蒡	山牛蒡属	A32	神农架蒿	艾蒿属
A13	大叶蟹甲草	蟹甲草属	A33	翅果菊	翅果菊属
A14	牛蒡子	牛蒡属	A34	大刺儿菜	刺儿菜属
A15	漏芦	漏芦属	A35	关苍术	苍术属
A16	橐吾	橐吾属	A36	牛膝菊	牛膝菊属
A17	轮叶泽兰	佩兰属	A37	蒲公英	蒲公英属
A18	条叶垂头菊	垂头菊属	A38	掌裂蟹甲草	华蟹甲草属
A19	福王草	福王草属	A39	蚂蚱腿子	蚂蚱腿子属
A20	鳢肠	鳢肠属	A40	苍耳	苍耳属

主要试剂及仪器:2 × Taq PCR Master Mix、植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Marker DL2000 均购自天根生化科技(北京)有限公司;引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。利用 Bio-Rad (T100TM Thermal Cycler) PCR 仪进行扩增,Bio-Rad 凝胶成像系统(SYSTEM GelDoc XR +),Bio-Rad 电泳槽(Mini-Subcell GT)电泳检测 PCR 产物。

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 的提取

本实验参考植物基因组 DNA 提取试剂盒方法试剂盒(TIANGEN,Beijing)提取 40 份种质资源库菊科药用植物种子的总 DNA,稀释至所需浓度,-80 °C 保存备用。

1.2.2 筛选引物

随机选择 10 个样本 DNA 对随机选取 50 条引

物序列进行筛选(加拿大 British Columbia 大学公布的第9套常用100条 ISSR 引物序列)^[9]。选取条带清晰的引物对所有的样本 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增。

1.2.3 ISSR-PCR 扩增

PCR 反应体系如下:模板 DNA (50 ng. μL^{-1}) 1 μL , 2 \times Taq PCR master Mix 10 μL (TIANGEN, Beijing), 引物 2 μL , 加无菌双蒸水 (ddH₂O) 至 20 μL 。实验对 PCR 退火温度进行了梯度筛选, 包括 (48, 50, 52, 54, 56 $^{\circ}\text{C}$), 退火温度最终选择为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。批样上样时, 所用反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min; 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳

将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 检测体系为: PCR 产物 3 μL , ddH₂O 5 μL , 6 \times Loading

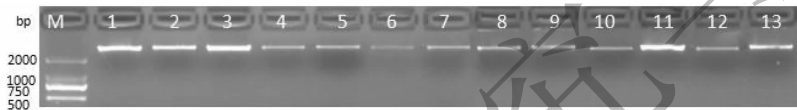


图1 DNA 提取电泳图(部分)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA (only part of listed)

注: 1-13 表示编号 A13-A25, M 为 2000 bp DNA marker。

Note: 1-13 represent A13-A25, M represents 2000 bp DNA marker.

2.2 引物筛选结果

首先对 10 个样品进行 PCR, 根据 PCR 电泳检测结果, 筛选出 PCR 产物具有差异、条带清晰的引物作为扩增所有样品的引物, 实验最终筛选了 8 对引物用于后续所有样品的多态性分析。引物筛选电泳图见图 2, 筛选的 8 对引物序列列表 2。

表 2 筛选的 8 个引物序列

Table 2 8 Primer sequences screened in the experiment

No.	Sequence (5'→3')
1	AGAAGAAGAAGAAGAGG
2	AGAAGAAGAAGAAGAAC
3	ACACACACACACACACG
4	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
5	ACACACACACACACACYT
6	ACACACACACACACACYA
7	ACACACACACACACACYG
8	GGAGAGGAGAGGAGA

2.3 ISSR-PCR 扩增结果

实验将筛选的 8 对 ISSR 引物, 在菊科 40 份材

料中进行 PCR 扩增, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 结果表明, 各材料间 DNA 多态性较高, 遗传差异较大。部分结果如图 3。

1.2.5 数据分析

本实验使用 NTSYS-pc2.1 对 ISSR 分子标记琼脂糖凝胶电泳结果图构建二元矩阵进行统计分析。扩增产物条带转化为数字, 在同一迁移率的条带记为一个位点, 有稳定条带记为“1”, 无条带记为“0”。Jaccard 的系数用于计算成对遗传相似性, UPGMA 聚类方法用于遗传树状图构建^[10]。

2 结果

2.1 DNA 提取结果

将提取的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。电泳结果显示用试剂盒提取的 DNA 质量较好, 电泳条带清晰。部分结果如图 1 所示。

料中进行 PCR 扩增, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 结果表明, 各材料间 DNA 多态性较高, 遗传差异较大。部分结果如图 3。

2.4 聚类分析

利用 NTSYS-pc2.1 软件对 ISSR 分子标记琼脂糖凝胶电泳结果图构建二元矩阵进行统计分析。筛选出的 8 个 ISSR 引物对 40 个菊科种质基因组 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增后, 共获得 68 个位点, 其中 68 个多态性位点, 多态性百分率为 100%。UPGMA 聚类方法用于构建遗传树状图(图 4)。40 份菊科属间的相似性系数介于 0.71 ~ 0.91 之间, 平均值 0.81。

由图可知在遗传相似性系数为 0.75 时可将 40 份种质分为 7 类, 其中树状图中的 A1、A27 到 A40 可聚为一大类, 此类物种数量最多。在遗传系数为 0.76 时又可将女苑、向日葵丈菊、秋英可聚为一类; 细叶鸦葱, 毛连菜, 大叶蟹甲草, 秋分草, 翅果菊, 橐吾, 草地麻花头, 蚂蚱腿子, 银背风毛菊, 轮叶泽兰, 条叶垂头菊, 单麻叶千里光, 一枝黄花, 火绒草等可聚为一类。鲤肠与菊科其他属植物遗传距离最远。

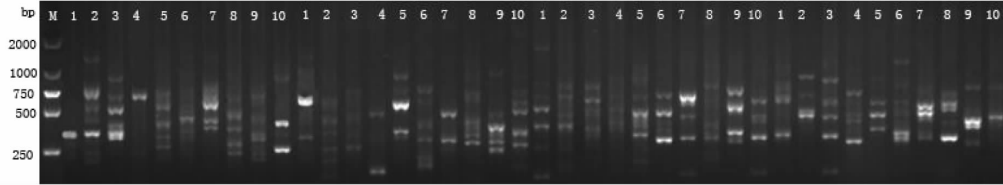


图2 引物筛选电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of primer screening results

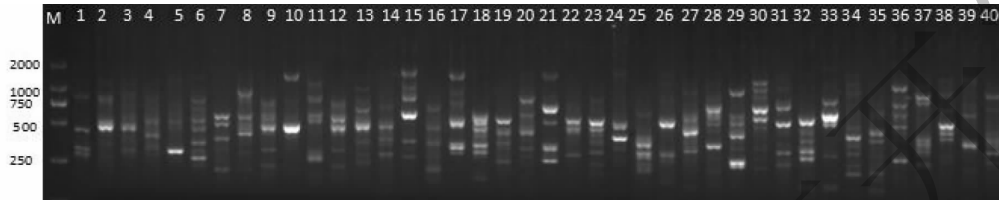


图3 2号引物扩增结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of NO. 2 ISSR primer

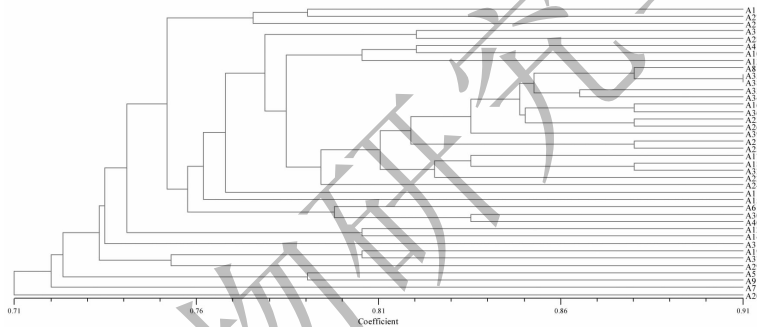


图4 遗传树状图

Fig. 4 The UPGMA phylogenetic tree of 40 Germplasms

3 讨论

由琼脂糖凝胶电泳结果可以看出,筛选出的8条ISSR引物能够有效区分菊科的40份种质;遗传树状图没有明显的类群区分,材料间的差异较大,多态性好,表明保存的菊科资源遗传背景丰富,后续菊科的种质资源保存,可以首先分析其多态性,尽量优先保存资源多态性高的种质资源。该方法对国家中药种质资源库资源的合理有效保存奠定了基础。

当前中药分子鉴定中,DNA条形码技术取得了很大成功,能够实现种属间的准确鉴定,如刘涛等^[11]利用 *psbA-trnH* 条形码成功将滇重楼与同属其他重楼鉴别开来;李栎等^[12]利用 ITS2 条形码序列对茜草科黎药植物的鉴定;于俊林等^[13]基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡进行了鉴定。虽然条形码技术取得了巨大成功,但条形码技术需要对克隆

片段进行测序分析,对于大样本资源的分子鉴定,成本比较高,本研究筛选的ISSR引物,通过PCR进行电泳,直接从电泳条带中计算其多样性,成本更低,操作更便捷,适合国家种质资源库大批量种质资源的初步鉴定。

本次实验仅选择了菊科40个属的40份材料,虽然筛选的ISSR引物扩增的条带清晰、多态性丰富,但是对于属内种质资源的准确鉴定,还需要扩大样本,再次筛选引物。后续研究可以采用多个ISSR引物,构建DNA指纹图谱,来实现对属内材料的准确鉴定。课题组也会在接下来的工作中对40份样品的形态学进行分析。

参考文献

- 1 Xiong YK(熊耀康), Yan ZY(严铸云). Pharmaceutical botany(药用植物学)[M]. Beijing: Peoples Medical publishing

- House, 2012.
- 2 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
 - 3 Jiang FX (姜福星). Study on genetic diversity of lily germplasm resources by ISSR [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University (南京林业大学), 2006.
 - 4 Zhang CP (张春平), He P (何平), He JX (何俊星), et al. ISSR Analysis on genetic diversity of *Fagopyrum cymosum* collected from eight wild populations [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2010, 41: 1519-1522.
 - 5 Liu J (刘君), Zhao Q (赵琴), Yang ZM (杨志明). Identification of nine kinds of bermudagrass by ISSR [J]. *Acta Pratacult Sin* (草业学报), 2012, 21: 159-165.
 - 6 Yao MZ (姚明哲). Studies on genetic diversity and structure of tea germplasm in China based on ISSR and EST-SSR markers [D]. Zhejiang: Zhejiang University (浙江大学), 2009.
 - 7 Fan XX (樊晓霞), Yan S (颜松), Tang JY (唐静仪), et al. RAPD analysis of seven species of medical plants from Asteraceae [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, 38: 8964-8966.
 - 8 Miao HB (缪恒彬), Chen FD (陈发棣), Zhao HB (赵宏波), et al. Genetic diversity and construction of fingerprinting of chrysanthemum cultivars by ISSR markers [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41: 3735-3740.
 - 9 Liu J (刘洁). The Comparative study of the morphological phenotype, pollen morphology and ISSR molecular between the white and weigela florida [D]. Hebei: Agricultural University of Hebei (河北农业大学), 2012.
 - 10 Sehgal D, Rajpal VR, Raina SN, et al. Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germplasm resources [J]. *Genetica*, 2009, 135: 457-470.
 - 11 Liu T (刘涛), Zhao YL (赵英良), Yang Y (杨莹), et al. Molecular identification of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using psbA-trnH DNA barcoding [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 758-762.
 - 12 Li L (李栋), Xiao J (肖憬), Su ZY (苏振宇), et al. Identification of Li medicine plants in Rubiaceae using ITS2 barcode sequence [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, 44: 1814-1818.
 - 13 Yu JL (于俊林), Zhao S (赵莎), Ren MB (任明波), et al. Identification of *Bupleurum* and *Bupleurum* with ITS2 barcode [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2014, 39: 2160-2163.
-
- (上接第 1737 页)
- 9 Shimada A, Kusano M, Takeuchi S, et al. Aspterric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus* [J]. *Z Naturforsch C*, 2002, 57: 459-464.
 - 10 Montenegro TG, Rodrigues FA, Jimenez PC, et al. Cytotoxic activity of fungal strains isolated from the ascidian *Eudistoma vannamei* [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9: 2203-2209.
 - 11 Wen L (温露), Du DS (杜敦帅), Liu F (刘凡), et al. Studies on the secondary metabolites of a marine mangrove fungus *Paecilomyces* sp. tree 1-7 [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报: 自科版), 2007, 46: 125-127.
 - 12 Gutierrez-Lugo MT, Woldemichael GM, Singh MP, et al. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. PI068 [J]. *Nat Prod Res*, 2005, 19: 645-652.
 - 13 Klaiklay S, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, et al. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34 [J]. *Arch Pharm Res*. 2012, 35: 1127-1131.