

山西与内蒙产蒙古黄芪的 ISSR 体系优化及遗传多样性分析

崔洁^{1,2,3}, 王丹丹^{1,4}, 王倩玉^{1,2,3}, 陈彤垚^{1,3}, 张福生^{1,3*}, 秦雪梅^{1,3*}¹山西大学中药现代研究中心;²山西大学化学化工学院;³山西大学地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室,太原 030006;⁴石家庄四药有限公司,石家庄 050021

摘要:本研究对影响蒙古黄芪 ISSR 反应体系的因素进行了优化,同时对蒙古黄芪的遗传多样性进行了分析。确立蒙古黄芪 ISSR 初始反应体系,采用单因素实验优化 ISSR 反应体系,确立了最终的 ISSR 体系。采用非加权平均距离法(UPGMA)对 8 批蒙古黄芪样品进行遗传多样性和聚类分析。此次实验获得的黄芪 ISSR-PCR 反应体系为:总体积 20 μ L,包含 10 \times PCR Buffer 2 μ L、dNTPs 0.5 mmol/L、*Taq* 酶 1.0 U、MgCl₂ 3.5 mmol/L、引物 0.25 μ mol/L、DNA 50 ng。14 条引物共扩增出多态性位点 118 个,遗传一致度在 0.492 1~0.730 2 之间,遗传距离在 0.314 5~0.709 1 之间。由聚类分析可知 8 批蒙古黄芪以产地分为了 3 类,内蒙古兴和县,山西浑源官儿乡各聚为一类,其余山西不同产地聚为一类。本实验表明建立的蒙古黄芪 ISSR 体系稳定,而山西与内蒙 2 个产地的蒙古黄芪遗传多样性丰富,该结果为黄芪良种选育及种质保护奠定基础。

关键词:蒙古黄芪;ISSR 体系优化;遗传多样性;种质资源

中图分类号:R282.71

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)11-1941-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.11.013

ISSR system optimization and genetic diversity analysis of *Astragalus membranaceus* produced in Shanxi and Inner Mongolia

CUI Jie^{1,2,3}, WANG Dan-dan^{1,4}, WANG Qian-yu^{1,2,3},
CHEN Tong-yao^{1,3}, ZHANG Fu-sheng^{1,3*}, QIN Xue-mei^{1,3*}¹Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine;²College of Chemistry and Chemical Engineering;³Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;⁴Shijiazhuang No. 4 Pharmaceutical. Co., Ltd., Shijiazhuang 050021, China

Abstract: In this study, the factors affecting the ISSR reaction system of *Astragalus membranaceus* were optimized, and the genetic diversity of *A. membranaceus* was analyzed. The initial ISSR reaction system of *A. membranaceus* was established, and the ISSR reaction system was optimized by single factor experiment. Then, the ISSR system was finally established. Genetic diversity and cluster analysis of 8 batches of *A. membranaceus* was analyzed by unweighted pair-group method arithmetic averages (UPGMA). The ISSR-PCR reaction system in this experiment (20 μ L) contained 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, 0.5 mmol/L dNTPs, 1.0 U *Taq* DNA polymerase, 3.5 mmol/L MgCl₂, 0.25 μ mol/L primer, and 50 ng template DNA. A total of 118 polymorphic bands were amplified by 14 primers. Genetic consistency ranged from 0.492 1 to 0.730 2 and the genetic distance ranged from 0.314 5 to 0.709 1. The results of UPGMA clustering showed that Xinghe County of Inner Mongolia, and Guaner Township of Hunyuan country, Shanxi Province belonged to one class, respectively, while the rest of Shanxi different areas were clustered into other class. This experiment showed that the establishment of the *A. membranaceus* ISSR system was stable. The genetic diversity of *A. membranaceus* in two producing areas in Shanxi and Inner Mongolia was rich, which laid a foundation for breeding and germplasm protection of *A. membranaceus*.

Key words: *Astragalus membranaceus*; ISSR system optimization; genetic diversity; germplasm resources

收稿日期:2019-05-13 接受日期:2019-10-22

基金项目:国家自然科学基金(31770362)

*通信作者 Tel:86-351-7019178; E-mail: ample1007@163.com, qinxm

@sxu.edu.cn

黄芪为传统大宗中药材之一,豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membra-*

naceus (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌之功效^[1],素有“十药八芪”之称。黄芪为多基原植物,目前市场上的流通商品药材主要为蒙古黄芪的栽培品,且栽培品主要来源于山西、甘肃、内蒙古等地,其中,山西、内蒙古主要为种子直播,多采取仿野生的生长方式,而甘肃则为育苗移栽的生长方式。目前,黄芪的栽培品存在以下几个问题:首先,黄芪的种子来源不一,人为过度干预造成种质退化;其次,生长方式不同使得黄芪的外观性状^[2-4]与内在化学成分含量发生了较明显的变化^[5-7],而这些又可能会对临床上的药效强弱产生一定影响。因此,我们需要对黄芪的遗传变异进行分析,便于对黄芪的种质进行复壮,并对生长方式进行考察,以期达到规范栽培管理。本文以山西与内蒙古的 8 批蒙古黄芪为例,优化了蒙古黄芪 ISSR 反应体系;同时对传统道地产区的山西与内蒙古产蒙古黄芪进行了种质遗传多样性与遗传距离的分析,为黄芪种质资源的保护及蒙古黄芪优良品种的挖掘奠定基础。

简单重复序列间扩增 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 分子标记是在 1994 年建立的一种分子标记技术,可用于种质资源遗传多样性分析、亲缘关系、品种鉴定与品种选育等^[8],如 Tang 等^[9] 菊科的 40 份种质进行了 ISSR 遗传多样性研究;Wang 等^[10] 运用 ISSR 分子标记结合相关分析技术,设计了快速预测远志药材样品中 tenuifolioside C 含量高低的特异性引物;Yang 等^[11] 根据 *psbA*/*trnH* 基因间区域的核酸序列与 ISSR 扩增结果,设计了 SCAR 标记的引物 15F/15R,其可用于鉴别韩国黄芪以及从中国进口的黄芪。

Zhang^[12] 优化了影响黄芪 ISSR 体系的以下因素:DNA 用量、dNTPs 浓度、*Taq* 酶用量、引物浓度。本实验不仅对以上因素进行了优化,还对激活 *Taq*

酶和影响退火温度的 Mg^{2+} 浓度,PCR 扩增的循环次数进行了优化,同时在此优化的体系下,对 8 批蒙古黄芪进行了遗传多样性分析。以期为蒙古黄芪种质资源的评价提供技术支持,促进蒙古黄芪种质保护及良种选育等工作的进一步开展。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TC-XP-D 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂),ZF-258 全自动凝胶成像分析系统(上海嘉鹏科技有限公司),TGL-16 高速台式冷冻离心机(湘仪离心机),XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司),NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo 公司),移液器(Eppendorf)。

1.2 试剂

Biowest 琼脂糖、 β -巯基乙醇均购于太原灏洋生物科技有限公司;GoldView I 型核酸染色剂,Solarbio 公司;DL 2000 DNA Marker、6 × Loading Buffer、PCR 试剂盒,TaKaRa 公司;CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(货号:DN14,50 次),北京艾德莱生物科技有限公司;实验所用到的引物根据大不列颠哥伦比亚大学(UBC)公布的 100 对 ISSR 引物序列进行引物合成,由大连宝生物(TaKaRa)公司合成;三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、硼酸等试剂,国产分析纯。

1.3 药材样本采集

本实验所用黄芪样本,主要采集于山西省以及内蒙古自治区,经山西大学中医药现代研究中心的秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao),存放于山西大学中医药现代研究中心标本室。详细信息见表 1。

表 1 黄芪样品信息表

Table 1 Information of *A. membranaceus* sample source

编号 No.	采集地 Collection place	简称 Abbreviation	生长方式 Growth mode
1	内蒙古兴和县	内蒙古兴和县	栽培
2	内蒙古兴和县店子乡南洼村	内蒙古南洼村	野生
3	山西省大同市浑源县泽清黄芪基地	山西浑源	栽培(平地移栽)
4	山西省大同市浑源县泽清黄芪基地	山西浑源	野生(山地直播)
5	山西省忻州市五寨县芦芽山	山西五寨芦芽山	野生

续表 1

编号 No.	采集地 Collection place	简称 Abbreviation	生长方式 Growth mode
6	山西省忻州市五寨县丘陵坡地	山西五寨丘陵坡地	半野生
7	山西省忻州市五寨县	山西五寨	栽培(平地移栽)
8	山西省大同市浑源县官儿乡木沟村麻黄沟	山西浑源官儿乡	野生

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取与检测

依据 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒的操作步骤进行实验,提取所有黄芪样本的 DNA,并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的完整性,同时用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测其浓度和纯度。

2.2 ISSR-PCR 初始反应条件及扩增程序

参考相关文献^[12-17],确定黄芪 ISSR-PCR 初始反应条件为:总体积 20 μL ,包含 10 \times PCR Buffer 2 μL 、2.5 mmol/L MgCl_2 、0.4 mmol/L dNTPs、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物、1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、DNA 模板约 20 ng,以 ddH_2O 补齐体积至 20 μL 。反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 充分变性 5 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,50 $^\circ\text{C}$ 退火 60 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s,30 个循环后,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 反应液 5 μL ,加 2 μL 的 6 \times Loading Buffer,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电压 105 V,电泳 30~40 min,在凝胶成像仪上观察并照相记录。

2.3 ISSR-PCR 反应体系优化设计

以 2 号黄芪的基因组 DNA 为模板,用 ISSR-PCR 初始反应体系及扩增程序对引物 UBC825 进行扩增,结果出现多态性条带,但条带不够清晰,甚至出现拖尾及非特异性扩增的条带,因此,在此初始反应体系的基础上采用单因素实验设计,依据①dNTP \rightarrow ②引物 \rightarrow ③ MgCl_2 \rightarrow ④*Taq* 酶用量 \rightarrow ⑤DNA 用量 \rightarrow ⑥退火温度 \rightarrow ⑦循环次数的顺序对影响黄芪 ISSR-PCR 反应的各个因素分别设置了不同水平的处理,具体实验过程如下所示:(1) dNTPs:0.2、0.4、0.47、0.54、0.6 mmol/L;(2) 引物:0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$;(3) MgCl_2 :1.2、2.4、3.0、3.5、4.0 mmol/L;(4) *Taq* 酶:1.0、1.5、2.0 U;(5) DNA:20、40、50、60、70、80 ng;(6) 退火温度:根据 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 确定该值,以该值为基础上下浮动 6 $^\circ\text{C}$,确定出退火温度的范围,在 PCR 仪上进行梯度退火筛选;(7) 循环次数:25、28、30 次。

2.4 ISSR-PCR 引物的筛选

参照大不列颠哥伦比亚大学 (University of

British Columbia, UBC) 所设计的 ISSR 引物序列,将 8 批样品的 DNA 等质量混合后进行引物的筛选以及退火温度的优化,最终确定 14 条扩增重复性好、条带清晰的引物,用于全部样本的扩增。

2.5 8 批黄芪样品的遗传一致度及遗传距离分析

遗传一致度(I)反映的是两个样品亲缘关系的远近程度,亲缘关系越接近,种群在所有位点的等位基因就越多,遗传一致度就越接近 1,反之,遗传一致度就越接近 0。遗传距离(D)反映的是两个样品的遗传变异程度,遗传变异越大,遗传距离越接近 1,反之,遗传距离越接近 0。当 $I = 1, D = 0$ 时,表示两样品的所有等位基因位点完全一致;当 $I = 0, D = \infty$ 时,表示两样品的等位基因位点完全不一致。本研究所采用的遗传一致度 I 与遗传距离 D 均由软件 POPGENE version 1.32 采用 Nei 的标准计算方法而得。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 反应体系优化的结果

3.1.1 dNTPs 浓度的优化结果

本实验先对 dNTPs 设置了 3 个浓度,分别为 0.2、0.4、0.6 mmol/L,见图 1A。dNTPs 在低浓度(0.2 mmol/L)的情况下,扩增产率低且条带模糊;dNTPs 浓度为 0.4 和 0.6 mmol/L 时条带较清晰;所以在

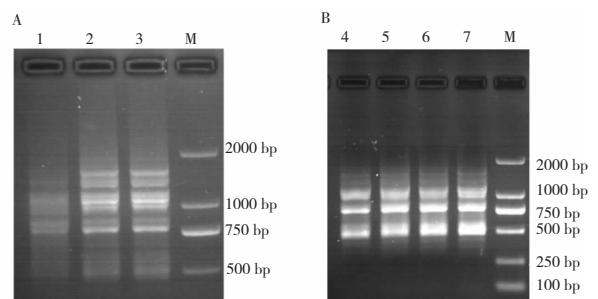


图 1 不同浓度 dNTPs 的 ISSR-PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of dNTPs

注:1~3 dNTPs 的浓度分别为 0.2、0.4、0.6 mmol/L;4~7 dNTPs 的浓度分别为 0.4、0.47、0.54、0.6 mmol/L;M: DL 2000 DNA Marker。Note: The concentrations of 1-3 dNTPs were 0.2、0.4、0.6 mmol/L, respectively; the concentrations of 4-7 dNTPs were 0.4、0.47、0.54、0.6 mmol/L, respectively. M: DL 2000 DNA marker.

0.4-0.6 mmol/L 之间设置了梯度进行进一步细化, 细化浓度分别为 0.4、0.47、0.54、0.6 mmol/L, 见图 1B。结果发现在 0.54 mmol/L 时条带最为清晰, 之后将其浓度设置为 0.5 mmol/L 时也能达到 0.54 mmol/L 相同的效果, 本着节约的原则, 所以 dNTPs 的浓度最终确定为 0.5 mmol/L。

3.1.2 引物浓度的筛选结果

本实验对引物浓度先设置了 3 个梯度, 分别为 0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$, 见图 2A。PCR 结果发现在 0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时条带差不多且清晰, 高浓度(0.6 $\mu\text{mol/L}$)时条带变模糊。所以在 0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 之间设置了不同浓度进行细化, 细化浓度分别为 0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 $\mu\text{mol/L}$, 见图 2B。结果发现引物浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时条带清晰且扩增稳定。所以引物最终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。

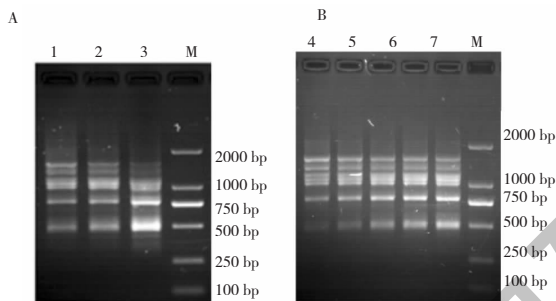


图 2 引物 (UBC825) 不同浓度的 ISSR-PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of primer UBC825

注: 1~3 引物浓度分别为 0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$; 4~8 引物浓度分别为 0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 $\mu\text{mol/L}$; M: DL 2000 DNA marker。

Note: 1-3 primer concentrations were 0.2、0.4、0.6 $\mu\text{mol/L}$; 4-8 primer concentrations were 0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 $\mu\text{mol/L}$, respectively. M: DL 2000 DNA marker.

3.1.3 MgCl_2 浓度的优化结果

本实验对 MgCl_2 设置了 3 个浓度, 分别为 1.2、2.4、3.6 mmol/L, 见图 3A。结果发现, 当 MgCl_2 浓度为低浓度(1.2 mmol/L)时 PCR 产物条带少且模糊, 当浓度为 2.4 mmol/L 时条带比 1.2 mmol/L 清晰; 当 MgCl_2 浓度为 3.6 mmol/L 时 PCR 扩增条带多且较清晰。所以接下来在 2.4-3.6 mmol/L 之间分别设置了以下浓度: 2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L, 结果如图 3B。当 MgCl_2 浓度为高浓度(4.0 mmol/L)时, 条带变模糊; MgCl_2 浓度为 2.5 mmol/L 时条带数少且不清晰; 3.5 mmol/L 时条带清晰度比 3.0 mmol/L 时的好, 所以选择 3.5 mmol/L 作为 MgCl_2

的终浓度。

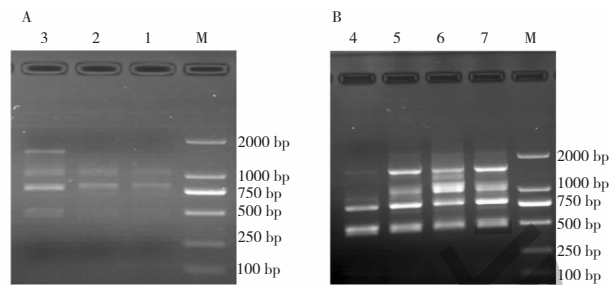


图 3 不同 MgCl_2 浓度的 ISSR-PCR

扩增结果琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis map optimized for the concentration of different MgCl_2

注: 1~3 MgCl_2 浓度分别为 1.2、2.4、3.6 mmol/L; 4~7 MgCl_2 浓度分别为: 2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L; M: DL 2000 DNA marker。

Note: 1-3 The concentrations of MgCl_2 were 1.2、2.4、3.6 mmol/L, respectively; the concentrations of 4-7 MgCl_2 were 2.5、3.0、3.5、4.0 mmol/L, respectively. M: DL 2000 DNA marker.

3.1.4 *Taq* 酶用量的优化结果

在确定了 dNTPs, 引物, MgCl_2 浓度的情况下, 对 *Taq* 酶量进行了考察, 设置浓度为 1.0、1.5、2.0 U, 结果如图 4 所示, 1.0、1.5、2.0 U *Taq* 酶条带相似, 但出于经济考虑最终确定 *Taq* 酶量为 1.0 U。

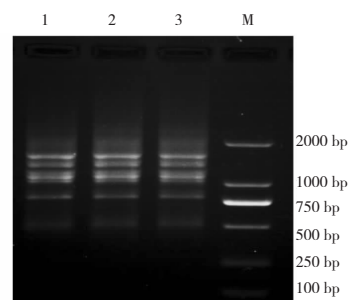


图 4 不同用量 *Taq* 酶的 ISSR-PCR 扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of ISSR-PCR with different amounts of *Taq* polymerase

注: 1~3 *Taq* 酶用量分别为 1.0、1.5、2.0 U; M: DL 2000 DNA marker。

Note: 1-3 *Taq* enzyme amounts were 1.0、1.5、2.0 U, respectively. M: DL 2000 DNA marker.

3.1.5 DNA 模板量的优化结果

DNA 加入量分别为 20、40、60 ng, 如图 5A 所示。结果发现, DNA 用量在 20 ng 是扩增条带模糊; 当 DNA 用量为 40 和 60 ng 时条带较清晰, 所以在 40、60 ng 附近进行 DNA 细化, 设置浓度为 40、50、60、70、80 ng, 结果如图 5B。在 20 μL 体系中, 50~80 ng 扩增出的条带最为清晰, 基于相同条件下模板量少原则, 最终选择 DNA 模板量为 50 ng。

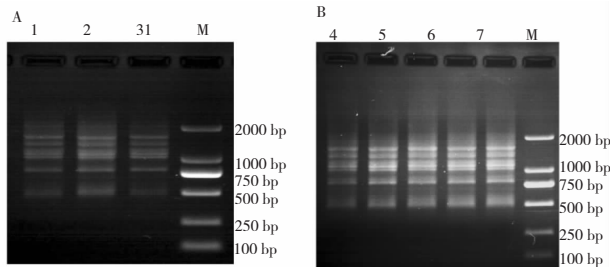


图5 不同用量 DNA 模板的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 5 Electrophoresis of ISSR-PCR with different amounts of DNA template

注:1~3 DNA 模板用量分别为 20,40,60 ng;4~8 DNA 模板用量分别为 40,50,60,70,80 ng;M:DL 2000 DNA marker。Note:1-3 DNA template amounts is 20,40,60 ng;4-8 DNA template amounts is 40,50,60,70,80 ng. M:DL 2000 DNA marker.

3.1.6 ISSR-PCR 退火温度的筛选结果

以引物 UBC825 进行梯度退火温度筛选为例,其 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$,为 50 °C,设置中心温度为 51 °C,梯度宽度为 6 °C,选择 47.6、50.5、53.2、55.8 °C 进行 PCR 扩增,结果如图 6。由图 6

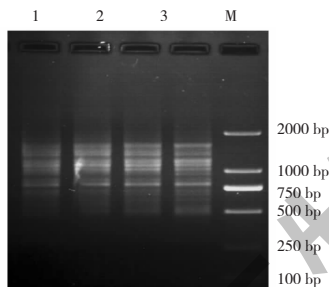


图6 UBC825 引物不同退火温度下的 ISSR-PCR 电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of ISSR-PCR with different concentrations of Primer UBC825

注:1~4 退火温度分别为 47.6、50.5、53.2、55.8 °C;M:DL 2000 DNA marker。Note:1-4 Annealing temperatures are 47.6、50.5、53.2、55.8 °C. M:DL 2000 DNA marker.

可知,引物 UBC825 在 47.6 和 50.5 °C 扩增条带模糊,53.2 °C 扩增条带清晰,55.8 °C 条带变模糊,所以 UBC825 退火温度最终选择 53.2 °C。

3.1.7 ISSR-PCR 循环次数的筛选结果

如图 7 所示,本实验分别进行了 25、28、30 次的 PCR 扩增,结果循环次数为 25 次时扩增产物条带模糊,28 次,30 次循环时,产物条带基本相同,为节约时间,最终循环次数选择 28 次。

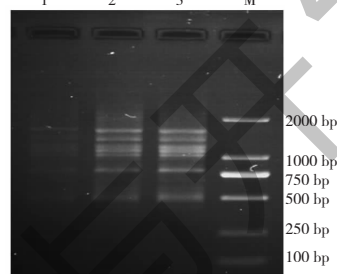


图7 不同循环次数下的 ISSR-PCR 扩增电泳图

Fig. 7 Electrophoresis of ISSR-PCR with different cycles 注:1~3 ISSR-PCR 循环次数分别为 25、28、30 次;M:DL 2000 DNA marker。Note:1-3 ISSR-PCR cycle times are 25、28、30 times; M:DL 2000 DNA marker.

最终确定反应体系为:总体积 20 μL,包含 10 × PCR Buffer 2 μL、0.5 mmol/L dNTPs、1.0 U *Taq* 酶、3.5 mmol/L MgCl₂、0.25 μmol/L 引物、50 ng DNA,加 ddH₂O 水补足至 20 μL。反应程序为:94 °C 充分变性 5 min,94 °C 变性 45 s,53 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 90 s,28 个循环后,最后 72 °C 延伸 7 min。

3.2 优化体系对样本的扩增结果

运用优化好的体系对 8 批蒙古黄芪样本进行 ISSR-PCR 扩增,图 8 为部分引物在优化好的体系下的扩增结果。由此可以看出本实验建立的黄芪 ISSR-PCR 体系稳定,可靠。

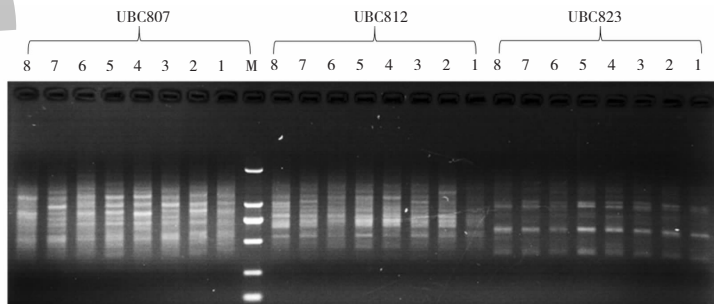


图8 部分引物的 ISSR-PCR 扩增结果图

Fig. 8 ISSR-PCR amplification results of some primers

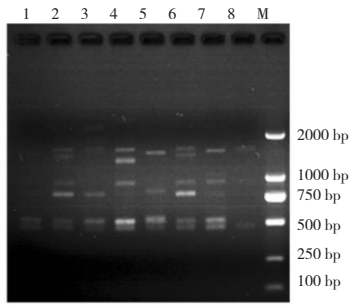


图9 引物 UBC825 对 8 批蒙古黄芪 ISSR-RCR 扩增结果图
Fig. 9 Amplification results of primers UBC825 on 8 batches of *A. membranaceus* ISSR-RCR

3.3 引物筛选扩增结果

将琼脂糖凝胶电泳图导入 ZF-258 全自动凝胶

表 2 黄芪 ISSR 扩增反应的引物及扩增的条带数

Table 2 Primers and amplified bands of ISSR amplification reaction

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature(°C)	扩增总条带数 Total number of amplification band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性位点百分数 Polymorphic locus percentage(PPL %)
UBC807	(AG) ₈ T	53	9	9	100
UBC809	(AG) ₈ G	51.7	8	7	87.5
UBC812	(GA) ₈ A	53	9	8	88.89
UBC823	(TC) ₈ C	53	7	7	100
UBC825	(AC) ₈ T	53	7	6	85.71
UBC826	(AC) ₈ C	53	7	7	100
UBC842	(GA) ₈ YG	54.4	10	10	100
UBC855	(AC) ₈ YT	51.7	8	8	100
UBC861	(TG) ₈ RC	53	8	8	100
UBC864	(ATG) ₆	51.7	11	11	100
UBC888	BDB(CA) ₇	54.4	11	11	100
UBC889	DBD(AC) ₇	51.7	7	7	100
UBC890	VHV(GT) ₇	51.7	14	12	85.71
UBC891	HVH(TG) ₇	54.4	10	10	100
总计	126	118	93.65		

注: B=(T,C,G); H=(A,T,C); R=(A,G); Y=(C,T); V=(A,C,T); D=(A,G,T)。

增, 扩增结果用软件 POPGENE version 1.32 采用 Nei 的标准计算方法 (Nei, 1978) 计算遗传一致度 I 与遗传距离 D, 所得结果见表 3。遗传一致度 I 与遗传距离 D 均是对样品间遗传分化程度的描述。由表 3 可以看出, 8 批黄芪样品的遗传一致度在 0.492 1 ~ 0.730 2 之间, 遗传距离在 0.314 5 ~ 0.709 1 之间, 说明黄芪样品的遗传分化程度较大。其中, 2 号

成像分析系统, 对其进行数据统计, 记录扩增条带的多态性。根据 DNA 条带的有无进行区分标记, 对条带清晰的记为“1”, 对缺失或模糊不清的标记为“0”, 对数据进行统计得到 01 矩阵。将统计结果 01 矩阵按照 POPGENE 1.32 软件的格式要求修改, 导入数据, 进行多态性条带百分率计算, 以及遗传一致性与遗传距离分析。结果如表 2。筛选的 14 条引物对 8 批蒙古黄芪样本进行扩增, 共扩增出 126 条带, 其中多态性条数 118 条, 多态性位点百分数为 93.65%, 平均每个引物扩出 8.43 个 DNA 片段, 其多态性为 93.6%, 说明黄芪遗传多样性丰富。

3.4 遗传相似系数与聚类结果分析

分别用 14 条引物对 8 批蒙古黄芪样本进行扩

内蒙古南洼村与 6 号山西五寨丘陵坡地样品的亲缘关系最近, 遗传一致度为 0.730 2, 遗传距离为 0.314 5; 1 号内蒙古兴和县与 4 号山西浑源样品的亲缘关系最远, 遗传一致度均为 0.492 1, 遗传距离均为 0.709 1。山西不同产地的遗传距离变幅为 0.347 6 ~ 0.559 6, 差异比较明显。

表 3 8 批黄芪样品的遗传一致性与遗传距离

Table 3 Genetic consistency and genetic distance of 8 samples of *A. membranaceus*

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8
1	****	0.563 5	0.611 1	0.492 1	0.571 4	0.531 7	0.571 4	0.539 7
2	0.573 6	****	0.634 9	0.658 7	0.547 6	0.730 2	0.579 4	0.547 6
3	0.492 5	0.454 3	****	0.658 7	0.706 3	0.650 8	0.595 2	0.579 4
4	0.709 1	0.417 4	0.417 4	****	0.634 9	0.658 7	0.571 4	0.523 8
5	0.559 6	0.602 2	0.347 6	0.454 3	****	0.658 7	0.619 0	0.507 9
6	0.631 6	0.314 5	0.429 6	0.417 4	0.417 4	****	0.611 1	0.547 6
7	0.559 6	0.545 8	0.518 8	0.559 6	0.479 6	0.492 5	****	0.603 2
8	0.616 8	0.602 2	0.545 8	0.646 6	0.677 4	0.602 2	0.505 5	****

3.5 8 批蒙古黄芪样品的多态性条带聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.1 软件,通过非加权类平均法 (unweighted pair-group method arithmetic averages, UPGMA),对 8 批蒙古黄芪样品的多态性条带进行聚类分析,并构建树状聚类图(见图 10)。由图可知,当匹配系数为 0.50 时,黄芪样品明显分为三类。其中,1 号内蒙古兴和县跟 8 号山西浑源官儿乡样品分别单独聚为一类,2 号内蒙古南洼村、6 号山西五寨丘陵坡地、3 号、4 号山西浑源、5 号山西五寨芦芽山、7 号山西五寨聚为一类。2 号内蒙古南洼村与 6 号山西五寨丘陵坡地样品间的遗传距离最近,二者亲缘关系最近。而 1 号内蒙古兴和县与 8 号山西浑源官儿乡的距离最远,说明二者亲缘关系较远。通过比较发现,UPGMA 聚类结果与遗传一致性与遗传距离的分析结果(表 3)基本是一致的。

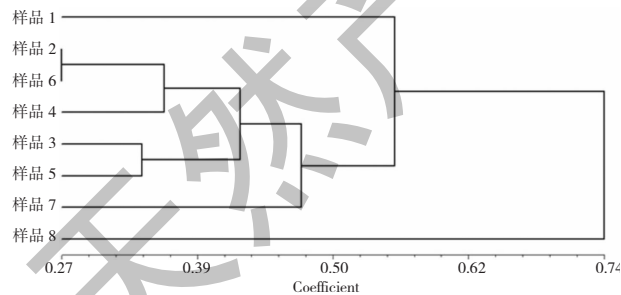


图 10 8 批蒙古黄芪样品的 UPGMA 聚类图

Fig. 10 UPGMA clustering map of 8 samples of *A. membranaceus*

4 讨论

本研究采用单因素实验对影响蒙古黄芪的 ISSR 反应体系的因素进行了优化,并对山西与内蒙古 2 个产地蒙古黄芪的遗传多样性进行了分析。而目前,植物基因多态性的研究多采用 DNA 分子标记,

DNA 间的差异可以通过分子标记呈现。DNA 分子标记技术有多种,其中 ISSR 技术具有操作简单、多态性和重复性好等特点,但是 ISSR 反应受到 PCR 反应中各因素的影响,不同的样本需要建立不同的 ISSR 反应体系^[18]。因此,本研究对影响 ISSR-PCR 反应的 dNTPs、引物、MgCl₂、Taq 酶、DNA、退火温度进行了优化。其中 dNTPs、MgCl₂、Taq 酶、引物浓度对 ISSR-PCR 扩增影响较大,另外,退火温度会影响模板与引物的结合,退火温度低容易发生错配,所以适当提高退火温度会降低错配率,但太高又会影晌复性,所以选择合适的退火温度是必要的。

通过对蒙古黄芪的聚类分析发现,虽然 1 号和 2 号蒙古黄芪样本均来自内蒙古兴和县,且二者地理位置较近,但在聚类图上却分为了 2 大类,这可能与它们生长的小环境有较大差异有关,使得它们逐渐适应了当地的气温、海拔高度、降水等,这与 Wang 等^[19]对长白山地区安图与和龙的聚类分析是相似的。2 号内蒙古南洼村与山西产地的 3-7 号蒙古黄芪样本虽然地理位置较远,但是聚为了一类,可能是产地之间相互引种造成了基因交流,使得遗传背景一致,这与 Zhang^[20]对不同产地蒙古黄芪聚类分析一致。聚类分析中 2 号内蒙古南洼村野生品、6 号山西五寨丘陵地半野生品与 4 号山西浑源野生品先聚在了一起,而后与山西其他产地栽培品聚为一类,这说明栽培品与野生品之间存在较高的遗传相似度,体现出它们亲缘关系更为接近,这可能与它们生长气候、降水、光照等有关,这与 Zhang^[12]对 6 个蒙古黄芪居群的聚类结果“先以生存方式野生、栽培聚类”分析一致;如果后续实验能对不同生长方式蒙古黄芪的化学成分含量进行分析和生长物候条件对蒙古黄芪的影响,以及建立化学成分与分子标记

间的联系,这将对蒙古黄芪种植资源的挖掘与保护提供帮助。

本实验仅对山西与内蒙古的 8 批蒙古黄芪进行了遗传多样性分析,后续会采用本实验建立的 ISSR-PCR 体系对大规模不同产地蒙古黄芪进行进一步验证,收集更多数据,同时结合样本表型数据对蒙古黄芪进行种质评价;其次,对本次收集样本进行化学成分含量测定,将此次的 PCR 结果与黄芪化学成分含量建立联系,为蒙古黄芪的种质复壮及挖掘品种潜力提供帮助。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302.
- 2 Du GJ. Study on the quality standards of geoh herbs of Hengshan Huangqi [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2013.
- 3 Liu J, Chen HB, Bai YJ, et al. Comparative study on the quality of Hengshan Huangqi under different planting methods [J]. China J China Mater Med (中国中药杂志), 2008, 5: 570-573.
- 4 Liu J, Yang H, Zhu XM, et al. Liu J, Yang H, Zhu XM, et al. Comparative study on wild products and cultivated products of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* in Daqingshan Area, Wuchuan County, Inner Mongolia [J]. China J China Mater Med (中国中药杂志), 2011, 36(12): 1577-1581.
- 5 Li K, Hao X, Gao F, et al. Identification of cultured and natural *Astragalus* root based on monosaccharide mapping [J]. Molecules, 2015, 20: 16466-16490.
- 6 Xiong YF, Wan YQ, Li K, et al. Quality comparison between traditional and cultivated *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* grown in Shanxi Hengshan area [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 1635-1643.
- 7 Wan YQ. Evaluation Study on the quality of Astragali Radix based on the chemical components [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2015.
- 8 Ren MY, Chen YJ, Zhang D, et al. Application and research progress of inter-simple sequence repeat (ISSR) marker in medicinal plants [J]. Biotechnology Bulletin (生物技术通报), 2017, 33(4): 63-69.
- 9 Tang XH, Hu J, Ren CX, et al. Analysis of genetic diversity and relationship in medicinal plants of compositae by ISSR [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发) 2018, 30: 1764-1768.
- 10 Wang HH, Wang DD, Jing XQ, et al. Prediction of tenuifoli-side C in *Polygala tenuifolia* with ISSR marker and correlation analysis [J]. Chin Med Mat (中药材), 2018, 8: 1827-1831.
- 11 Yang JY, Kim HK, Park SJ. Development of genetic marker specific for Korean hwangqi medicine (*Radix Astragali*) [J]. Food Sci Biotechnol, 2011, 20: 1561-1567.
- 12 Zhang R. Analysis on genetic diversity of *Radix Astragali* by ISSR Marker [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University (山西农业大学), 2014.
- 13 Jiang LL, Guo JF, Zhang CL, et al. Genetic diversity analysis of germplasm of authentic *Astragalus membranaceus* in Inner Mongolia [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 2279-2283.
- 14 Wu HY. The comparison of DNA fingerprint and infrared spectrum in *Astragalus* and *Radix Hedysari* originated from Gansu [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University (甘肃农业大学), 2012.
- 15 Huang LK, Chen ZH, Zhang XQ, et al. A comparative analysis of molecular diversity of erect milkvetch (*Astragalus adsurgens*) germplasm from north China using RAPD and ISSR markers [J]. Biochemical Genetics, 2009, 47(1-2): 92-99.
- 16 Zhu TT, Jin L, Liu XR, et al. Analysis of genetic relationship of *Astragalus membranaceus* and *Codonopsis pilosula* from different cultivars (varieties) by ISSR [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志), 2015, 22(2): 79-82.
- 17 Wang XF. Study on genetic diversity of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* populations in Inner Mongolia [D]. Nei Menggu: Inner Mongolia University (内蒙古大学), 2014.
- 18 Wang DD. Study on the correlation between traditional "assessing quality by distinguishing TCMM features" and modern quality evaluation methods of *Polygala tenuifolia* [D]. Taiyuan: Shanxi University (山西大学), 2017.
- 19 Wang M, Wang JR, Li DY, et al. SRAP Analysis of germplasm resources of wild *Astragalus membranaceus* Maxim in Changbai Mountain Area [J]. North Hortic (北方园艺), 2016, 21: 94-97.
- 20 Zhang LT. The Study on assessment of germplasm resources of *Radix Astragali* [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Science (中国协和医科大学), 2007.