

野生天门冬遗传多样性的 ISSR 分析

欧立军^{1,2,3}, 王俞人¹, 刘佳蒙¹, 王 敏¹

(1. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418000; 2. 怀化学院 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000;

3. 怀化学院 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008)

摘要:通过 ISSR 技术对 19 个野生天门冬居群共 67 个个体进行遗传多样性分析。结果表明:用 13 个随机引物共扩增出 125 条清晰条带,其中 92 条具多态性,平均多态性位点比率为 73%,建立了不同居群的 ISSR 标记;Nei's 基因多样性指数 $H = 0.19$, Shannon's 多样性指数 $I = 0.30$, 遗传分化指数 $G_{st} = 0.8206$ 。聚类分析表明,青海、云南和贵州省的 5 个居群聚为一大支,其它居群为另一大支。野生天门冬种内具有较高的遗传多样性,遗传变异主要存在于居群间;ISSR 标记可以作为研究天门冬遗传多样性及居群鉴定的有效标记。

关键词:天门冬;居群;ISSR;遗传多样性

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0164-03

天门冬(*Asparagus cochinchinensis* Lour. Merr.)是治疗肺燥、干咳、咽干口渴、肠燥便秘等症的良好药材^[1],是《中国药典》记载的传统中药,同时也是多个民族的常用药。我国大多省都有分布,主产于贵州、云南和湖南等省,道地产区不明确。天门冬药材主要利用野生资源,随着需求量的增大,野生资源日益枯竭,人工栽培种植是解决紧缺的有效途径,确定天门冬药材的道地产区是人工引种栽培的重要前提。

ISSR(Inter simple sequence repeat,简单重复间隔序列)标记是以 PCR 技术为基础的分子生物学技术,具有模板需要量少、结果便于分析、引物设计简单等特点^[2],广泛应用于物种鉴定、遗传作图、基因定位、系统发育与进化等领域^[3-5]。天门冬的形态结构简单,其药用部位块根形态相近,传统的形态学方法很难将不同产地的天门冬药材严格地区分,运用分子标记技术是其鉴定的重要手段。该研究运用 ISSR-PCR 技术对 19 个野生天门冬居群的 67 个个体进行分析,揭示不同产地天门冬的亲缘关系,了解其种内变异,建立不同居群天门冬的分子标记,为鉴定和区分不同居群天门冬提供理论基础。

1 材料与方法

2009~2010 年,采集野生天门冬的 19 个居群,各居群随机选取 3~5 个样本,栽培于怀化学院生命科学系种质园(表 1),经由怀化学院曾汉元教授鉴定。采用 CTAB 法^[6]提取天门冬新鲜叶片的基因组 DNA。

第一作者简介:欧立军(1976-),男,湖南长沙人,博士,现从事药用植物遗传与分子生物学研究工作。E-mail:ou9572@126.com。
基金项目:湖南省高校创新平台开放基金资助项目(09K106)。
收稿日期:2011-04-21

德国产 Mastercycler gradient PCR 仪, Tanon 4100 凝胶成像系统。ISSR 引物由上海生工合成,PCR 相关试剂产自北京天根生化科技有限公司。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物的筛选

ISSR-PCR 反应所用的引物由上海生工公司合成,共从 50 个随机引物(17~18 bp)中筛选出 13 个扩增条带清晰、多态性明显、反应稳定的引物用于 19 个居群的 67 个个体的扩增,每个选定的引物至少重复扩增 2 次,每条引物退火温度都单独摸索得到(表 2)。

表 1 用于 ISSR 分析的不同居群天门冬

代号	居群	样本	代号	居群	样本
HZ	浙江杭州	5	NN	广西南宁	3
DS	贵州独山	5	KL	贵州凯里	3
GZ	广东广州	3	FQ	贵州福泉	3
HS	湖南衡山	3	WA	贵州瓮安	3
YQ	贵州余庆	3	HX	贵州花溪	3
YZ	湖南永州	3	QX	贵州黔西	3
XN	湖南新宁	3	XY	贵州兴义	5
PY	湖南坪阳	3	QJ	云南曲靖	5
GX	湖南甘溪	3	XI	青海西宁	5
YH	贵州沿河	3			

表 2 筛选的天门冬 ISSR 引物和最佳退火温度

引物	序列	退火温/℃	引物	序列	退火温度/℃
ISSR-807	(AG) ₈ T	50.6	ISSR-849	(GT) ₈ YA	50.7
ISSR-811	(GA) ₈ C	52.2	ISSR-851	(GT) ₈ YG	52.1
ISSR-815	(CT) ₈ G	51.9	ISSR-853	(TC) ₈ RT	50.3
ISSR-823	(TC) ₈ C	52.5	ISSR-857	(AC) ₈ YG	51.8
ISSR-825	(AC) ₈ T	50.5	ISSR-861	(ACC) ₆	60.2
ISSR-827	(AC) ₈ G	51.5	ISSR-892	HVH(TG) ₇	59.5
ISSR-843	(CT) ₈ RA	50.3			

2.2 PCR 扩增及产物检测

ISSR-PCR 反应在 25 μ L 的 PCR 反应体系中进行,内含 1 \times PCR Buffer 2.5 μ L,1.25 mmol/L Mg^{2+} ,0.32 mmol/L dNTPs,1.2 μ mol/L 引物,1.5 U *Taq* 酶,40 ng 模板。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 退火 70 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶中电泳分离 1.5 h,电压 5 V/cm。电泳结束后观察并拍照纪录。

2.3 统计分析与数据处理

每个引物均重复扩增和电泳 2 次,选取稳定清晰的条带进行统计分析。电泳图谱的每条带(DNA 片段),均为 1 个分子标记,代表 1 个引物的结合位点。根据分子标记的迁移率及有无来统计所有的二元数据,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。POPGEN32 软件计算各居群的多态位点百分率(PPL),Nei's 基因多样性指数(*H*),Shannon's

多态性信息指数(*I*),基因分化系数(*Gst*),居群总基因多样性(*Ht*),居群内基因多样性(*Hs*),并根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,构建系统树。

2.4 不同天门冬居群的遗传多样性

天门冬 19 个居群的 67 个个体经过 13 个 ISSR 引物分析后,共得到 125 条带,相对分子质量在 100~2 000 bp,其中多态性带 92 条,多态性位点比率为 73.00%;每条引物平均扩出条带 9.6 条,其中多态性条带为 7.07 条。图 1 为引物 825 的扩增结果。Nei's 基因多样性指数 *H* = 0.19,Shannon's 多态性信息指数 *I* = 0.30。天门冬不同居群内的多态性位点百分率在 12.00%~25.00%,其中最高的是贵州黔西居群,为 25.00%,贵州花溪居群次之,为 24.00%,最低的是青海西宁居群,为 12.00%。Nei's 基因多样性指数(*H*)为 0.03~0.08,Shannon's 多态性信息指数(*I*)为 0.06~0.13。

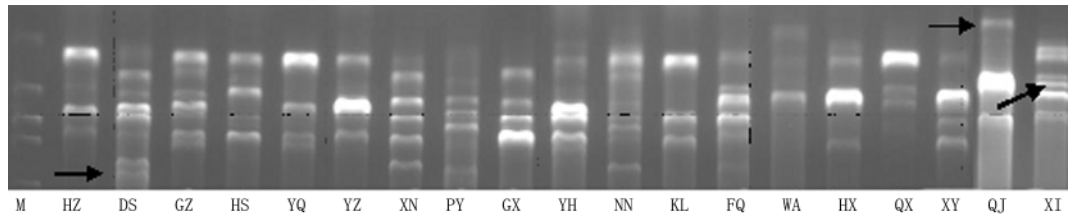


图 1 引物 825 对 19 个天门冬居群(各取 1 个样本)的扩增图
注:M- marker,材料代号见表 1,箭头所示为特异带。

2.5 不同天门冬居群的特异条带分析

经过比较分析找到 19 个居群天门冬的特异条带(表 3)。每个居群的特异带条数不一,在 1~3 条范围

内波动,这些特异条带可以区分这些不同居群的天门冬,作为鉴定不同居群天门冬的分子标记。

表 3 不同居群天门冬特异带

居群	特异带条数	引物序号	片段大小 /bp	居群	特异带条数	引物序号	片段大小 /bp
HZ	3	807	300,350	NN	2	807	200
		823	420			853	260
DS	2	825	1 250	KL	1	815	180
		892	240				
GZ	3	811	240	FQ	2	815	650
		827	410			811	420
		853	130				
HS	1	861	250	WA	2	827	470
						849	260
YQ	1	853	200	HX	1	857	480
YZ	2	849	420	QX	1	849	750
		857	340				
XN	3	815	300	XY	2	861	420
		823	430			892	400
PY	1	827	200	QJ	2	825	80
						851	500
GX	1	851	160	XI	2	825	200
						843	400
YH	2	861	300				
		853	400				

2.6 天门冬不同居群的遗传分化分析

根据总的基因多样性(*Ht*) 和居群内遗传多样性

(*Hs*) 来计算居群间遗传差异在总遗传变异中所占的比例。天门冬 *Ht* = 0.33,*Hs* = 0.10,居群间的遗传分

化指数(G_{st})为0.8206。这表明有82.06%的变异是存在于居群间的,17.94%的变异是存在于居群内的。天门冬居群内的遗传分化较低,绝大部分的遗传分化存在于居群间。

天门冬的UPGMA聚类图显示,发现19个居群天门冬分为二大支,瓮安珠藏居群、福泉居群、黔西居群、花溪居群、兴义居群、曲靖居群和西宁居群为一大支,其它居群为另一大支。第二大支又可分为二小支,广州居群、杭州居群独山居群、和余庆居群为一小支。

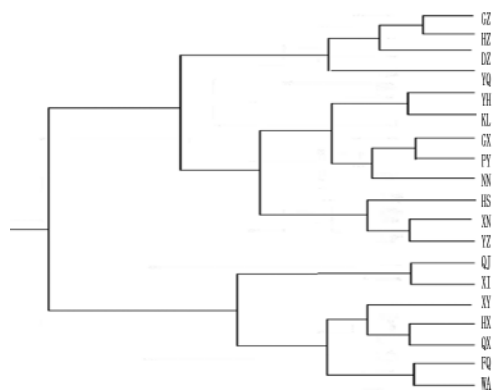


图2 基于ISSR的天门冬同源树

3 讨论与结论

天门冬在我国分布广泛,随着野生资源的逐渐减少,引种栽培成为解决资源匮乏和控制价格攀升的有效方法之一,但是不同产地及其人工栽培带来药材质量的差异十分明显。ISSR标记不但具有SSR标记的简便易行、快速方便等特点,还具有多态性高、所揭示遗传多态性丰富等优点,广泛应用在不同产地药用植物的遗传多样性、物种与药材的鉴别中^[7-9],而天门冬中尚未见报道。该文通过引物筛选试验,从50个ISSR引物中筛选到13个针对天门冬鉴别的有效引物,得到了不同产地天门冬的特异条带,建立了不同产地天门冬的ISSR指纹图谱,为不同居群天门冬的鉴定提供了良好的分子标记。天门冬在贵州分布广,且分

布区域的纬度跨域较大,该研究的结果表明,该省天门冬较原始,遗传变异较大,是进行引种栽培和良种选育的首选。基因的变异受环境的影响,从而导致植物的分布与遗传发育与地理位置(特别是纬度)存在一定的关系,地理位置接近的植物的遗传距离较小,亲缘关系较近^[10-12]。该研究中的19个产地的天门冬中,纬度比较接近的材料亲缘关系较近,优先聚类,纬度相差越远,遗传距离越大,说明天门冬的遗传变异与纬度有明显的相关性,与经度的关系不大;同时研究发现,天门冬的变异主要发生在居群间,居群内的变异很小,因此,在天门冬选育的过程中,除个体选择为主外,补充其它产地种质,以促进基因交流和扩大基因源也是非常重要的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版[S]. 北京:中国医药科技出版社,2005.
- [2] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613.
- [3] 温文婷,贾定洪,郭勇,等. 中国主栽银耳配对的系统发育和遗传多样性[J]. 中国农业科学,2010,43(3):552.
- [4] 王翀,周天华,杨雪,等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物[J]. 中草药,2008,39(4):588.
- [5] 邵清松,郭巧生,张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药,2009,40(12):1971.
- [6] Rogers O S, Bendich A J. Extraction of DNA plant tissue, plant molecular [M]. In: Gelvin S B, Schilpe R A, Verna D S (ed.); Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1988: 1-10.
- [7] 陈丽雅,赵鹏,白岩,等. 不同种源益母草遗传关系的 ISSR 分析[J]. 中国中药杂志,2009,34(11):1343.
- [8] 张春平,何平,胡世俊,等. 黄连遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药,2009,40(10):1630.
- [9] 白成科,俞君如,于凤,等. 山茱萸种质资源的 ISSR 遗传多样性分析与初级核心种质库的构建[J]. 西北植物学报,2009,29(12):2401.
- [10] 郭丁丁,马逾英,唐琳,等. 白芷种质资源遗传多样性的 ISSR 研究[J]. 中草药,2009,40(10):1627.
- [11] 朱世华,张启发,王明全. 中国普通野生稻核糖体 RNA 基因限制性片段长度多态性[J]. 遗传学报,1998,25(6):531.
- [12] 张春平,何平,胡世俊,等. 药用三角叶黄连遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):3176.

ISSR Analysis of Genetic Diversity of *Asparagus cochinchinensis*

OU Li-jun^{1,2,3}, WANG Yu-ren¹, LIU Jia-meng¹, WANG Min¹

(1. Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000; 2. Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000; 3. Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract: The genetic diversity of 67 individuals from 19 populations was analyzed by ISSR. The results showed that 13 primers were selected to produce highly reproducible ISSR bands, 92 showed polymorphism among 125 amplified bands and the percentage of polymorphic bands reached 73%, ISSR marker of different populations was found. Nei's gene diversity index (H) was 0.192, Shannon's information index was 0.30, genetic differentiation index was 0.8206. The Clustering tree showed the populations of Qinghai and Yunnan province, 5 populations of Guizhou province were a branch, others populations were another branch. *Asparagus* had a high genetic diversity and the majority of genetic variation occurred among populations. The ISSR marker could be used for analysis of genetic diversity and identification of genetic variation of *Asparagus cochinchinensis*.

Key words: *Asparagus cochinchinensis*; populations; ISSR; genetic diversity