

石斛种质资源遗传多样性的 PAGE 分析

张文龙^{1,2}

(1. 贵阳中医学院 药学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省农业科学院 旱粮研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要:以 16 种石斛属植物为试材, 采用 PAGE 法, 利用筛选获得的 6 条理想 ISSR 多态性引物, 研究了小分子量片段的差异对石斛属植物分类的影响。结果表明: 试验结果与经典形态分类相似, 但也有一定差别; PAGE 法多态性比率高, 可进一步从分子水平揭示石斛属植物的遗传多样性与亲缘关系。

关键词:石斛; 遗传多样性; PAGE

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0104-03

石斛是我国久享盛誉的名贵常用中药, 以新鲜或干燥的茎入药。始载于《神农本草经》, 列为上品。因其益胃生津, 滋阴清热效果显著, 历版《中国药典》均予收载。我国药用石斛的原植物主要来源于兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)植物, 主要分布于西南、华东及华南地区, 全国约有 76 种, 其中有近 40 种被作为药用^[1], 因

其基源复杂, 形态与化学成分相似, 利用常规的鉴定方法对其进行形态学特征比较、显微鉴定及理化鉴定等, 往往很难得出正确有效的结论, 石斛属植物目前已经成为业界公认的最难鉴定的品种之一。

ISSR 分子标记是目前使用最多、效果最好的分析基因遗传多样性的分子标记技术之一, 已广泛应用在生命科学的各个领域。它在引物设计上比 SSR 技术简单, 不需要知道基因组序列即可设计引物并进行扩增, 同时又可比 RFLP、RAPD、SSR 揭示更多的遗传多态性, 稳定性和重复性更好, 试验精度更高^[2]。国内利用琼脂糖凝胶电泳检测石斛 ISSR 分子标记的研究已有诸多报

作者简介:张文龙(1976-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事药用植物栽培育种与分子生物学等研究工作。E-mail: wlzhsst@yeah.net.
基金项目:贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字[2013]2072 号); 贵阳中医学院博士资金资助项目[(2012)01 号]。
收稿日期:2014-03-31

Bioinformatics Analysis of the NBS Resistance Gene Analogs in Cucumber

WANG Chang-tong, CAO Gang-qiang, LIANG Cong-min, XIE Bing-xin, YAN Fei-xiang
(Biological Engineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract: The bioinformatics of cucumber NBS resistance gene analogs (RGA gene) was analyzed using bioinformatics software (NCBI, DNAMAN, nnPredict, AntheProt, SOSUI, CBS, SWISS-MODEL). The physical and chemical properties, structure and function of the cucumber NBS resistance gene analogs (RGA gene) protein were predicted, in order to provide a theoretical basis for the further study on the regulation mechanism of disease resistance of cucumber. The results showed that the RGA gene encoded a length of 84 amino acid protein. Its molecular weight was 10 964. 32 Da. The theoretical isoelectric point was 9. 36. This gene had no transmembrane domain. It mainly was located in the cytoplasm. Evolutionary analysis indicated that the cucumber NBS resistance genes had the close genetic relationship with watermelon, also loofah. The secondary structure on this gene was α - β type, with the more obvious three helices and two fold. The protein had three functional sites: N-myristoylation site, Casein kinase II phosphorylation site and Protein kinase C phosphorylation site. And predicted that RGA protein could acts as a coenzyme role in the regulation of biochemical reactions, mediated regulation of gene expression in the stress resistant associated signaling pathways, as well as it could play an important physiological function during the development of seed embryos.

Key words: cucumber; NBS; RGA; bioinformatics

道,而利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)检测石斛分子标记遗传多样性的报道较少。该研究另辟蹊径,利用 PAGE 方法对从云南、贵州收集的 16 种常见石斛进行了 ISSR 分子标记检测,研究了小分子量片段在不同石斛种间表现的差异,以期对石斛属的物种鉴定与亲缘关系构建补充一定的分子水平依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 16 种石斛来自贵州省黔西南州和云南省,于花期经过鉴定确认不同石斛种名(表 1)。

表 1 石斛材料名称及来源

Table 1 Material and source of *Dendrobium* tested in experiment

编号 Number	名称 Name	来源 Source	类型 Type
1	密花石斛 <i>D. densiflorum</i> Lindl	贵州	野生
2	长距石斛 <i>D. longicornu</i> Lindl	云南	野生
3	叠翅石斛 <i>D. aurantilacum</i> Rchb. f. var. <i>denneanum</i> (Kerr.) Z. H. Tsi	贵州	野生
4	苏瓣石斛 <i>D. harveyanum</i> Rchb. f.	云南	野生
5	玫瑰石斛 <i>D. crepidatum</i> Lindl. et Paxt.	贵州	野生
6	棒节石斛 <i>D. findlayanum</i> Par. et Rchb. f.	云南	野生
7	重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i> Rchb. f.	贵州	野生
8	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i> Hook	贵州	野生
9	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i> Lindl.	贵州	野生
10	喇叭唇石斛 <i>D. lituiflorum</i> Lindl	云南	野生
11	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i> (L.) Sw.	云南	野生
12	金钗石斛 <i>D. nobile</i> Lindl.	云南	野生
13	串珠石斛 <i>D. falconeri</i> Hook.	云南	野生
14	翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i> Rchb. f.	云南	野生
15	铁皮石斛 <i>D. officinale</i> Kimura et Migo	云南	栽培
16	美花石斛 <i>D. loddigesii</i> Rolfe	贵州	野生

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 选取幼嫩的叶片,采用 CTAB 改良法^[3-4]提取石斛基因组 DNA,提取 DNA 浓度稀释为 50 ng/ μ L。

1.2.2 ISSR 反应体系建立 PCR 扩增反应总体积 20 μ L,其中包括 2 μ L 10 \times PCR buf. (+ (NH₄)₂SO₄ - MgCl₂), 2 μ L MgCl₂ (25 mM), 1.5 μ L dNTP (2 mM), 2.4 μ L 引物(5 μ M), 0.15 μ L Taq 酶(5 U/ μ L), 2 μ L Glycerol (99%), 5 μ L 基因组 DNA (50 ng/ μ L), 4.95 μ L dd H₂O。扩增反应程序:93 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 30 个循环(93 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳,用硝酸银染色检测。

1.3 数据分析

ISSR 标记带型以 1 和 0 建立数据库,在相同迁移位置上,有带记为 1,无带记为 0,生成 0/1 矩阵。利用 NTSYSpc 2.10 软件,得到石斛种间相似系数矩阵,然后以 UPGMA 法画出品种聚类图。

2 结果与分析

2.1 扩增片段多态性分析

该试验使用 70 条 ISSR 引物对石斛属植物材料基因组 DNA 多态性进行了检测,最终获得 6 条扩增效果较理想的引物,在不同的石斛属植物中具有清晰稳定的条带。用这 6 条引物对所有 16 份材料进行扩增检测,由表 2 可知,扩增出稳定的多态性条带共 68 条,每个引物在石斛的基因组 DNA 中扩增出 8~17 个 DNA 片段,平均每个引物扩增出 11.3 条 DNA 片段,其多态性为 100%,其中引物 UBC864 扩增的条带多达 17 条(图 1)。

表 2 6 个 ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplified results by 6 ISSR primers

引物名称 Name sequence	引物序列 Primer sequence	条带总数 Total bands	多态性位点数 Polymorphic loci	多态百分比 Polymorphic percentage/%
UBC807	(AG) ₈ T	8	8	100
UBC810	(GA) ₈ T	15	15	100
UBC815	(CT) ₈ G	11	11	100
UBC862	(AGC) ₆	9	9	100
UBC864	(ATG) ₆	17	17	100
UBC868	(GAA) ₆	8	8	100

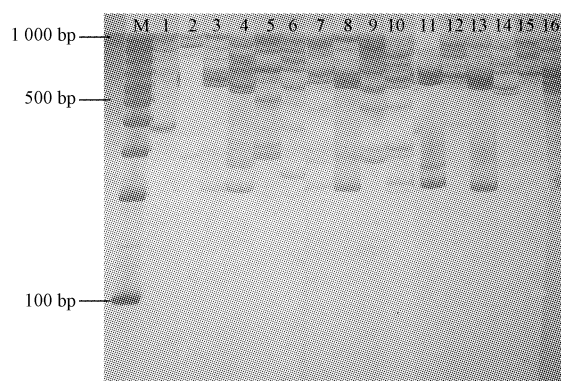


图 1 引物 UBC864 扩增结果电泳图

Fig. 1 Amplified bands from primer UBC864

注:M 为 marker, 1~16 同表 1。

2.2 ISSR 指纹图谱相似性聚类分析

根据 PAGE 分析建立的 1, 0 型数据,通过 NTSYSpc 2.10 软件计算出石斛品种成对种间遗传相似系数介于 0.582~0.897 之间,表明该试验所选用的 16 种石斛材料遗传相似程度较高。其中密花石斛与长距石斛之间遗传相似系数最大,表明二者之间的亲缘关系最近,聚为一组。叠翅石斛与流苏石斛之间的遗传相似系数(0.838)次之,也较早地聚为一组。细茎石斛与喇叭唇石斛(0.588)、棒节石斛(0.588)之间的遗传相似系数在所有成对石斛中最小,说明细茎石斛与后二者之间的亲缘关系较远。在聚类分析的基础上(图 2),在以相似系数 0.69 为阈值时,所有参试品种分为 3 类:I:密花石斛、长距石斛、叠翅石斛、重唇石斛、流苏石斛、束花石斛、细茎石

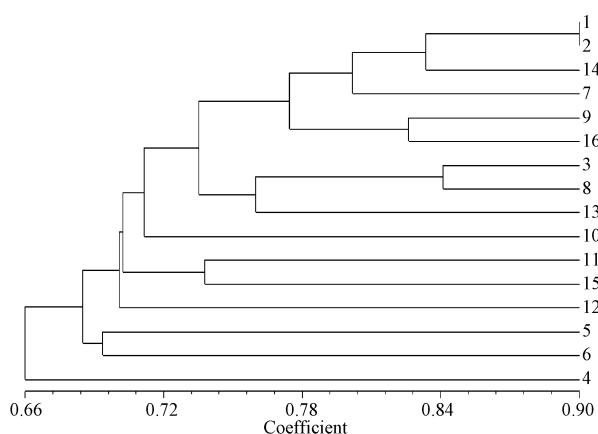


图2 基于PAGE的16种石斛的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis based on PAGE for 16 species of *Dendrobium*

斛、喇叭唇石斛、金钗石斛、串珠石斛、翅梗石斛、铁皮石斛、美花石斛;II:玫瑰石斛和棒节石斛;III:苏瓣石斛。

3 讨论

核酸电泳常用的方法有琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳,琼脂糖浓度常用1.5%~2.0%,由于具有操作简单、快速、灵敏等特点,成为目前分离、鉴定和纯化核酸首选的标准方法,在石斛遗传多样性分析与药材鉴定中广泛使用,已有较多研究。同琼脂糖凝胶电泳相比,PAGE不仅载样量大,电渗作用比较小,回收的DNA样品纯度高,而且其最大的优点是具有高分辨力,对于长度小于1 000 bp的DNA片段具有非常好的效果。该研究中,利用筛选获得的6个多态性引物,检测到68个多态性位点,相当于有68个性状的差异,充分证实了PAGE技术在石斛种质资源遗传多样性与亲缘关系分析中的高效性。

石斛属于天然异花授粉植物,中间类型多,植物变异大,国内学者由于采用的研究方法和手段的不同,在石斛属植物分类研究方面多持有不同的意见。该试验

利用ISSR分子标记结合PAGE法对于石斛属植物部分种间亲缘关系开展了进一步探索,研究结果显示的亲缘关系与吉占和等^[5]的形态分类具有一定的相似性。大多数黄草类石斛归于石斛组,说明石斛形态上的相似性与DNA的相似性有一定的相关。但是也有少数种类与传统的形态分类有差别,例如黑毛组的2种石斛并没有首先聚为一类,而黑毛组的长距石斛与顶叶组的密花石斛遗传相似系数更大一些,首先聚为一类后再与黑毛组的另一种石斛翅梗石斛聚为一类,这与任羽等^[6]的研究结果具有一定的相似性,进一步表明植物的外部形态是其基因与环境共同作用的结果。

由于石斛生境独特,濒临灭绝,获取难度越来越大。因此,该试验收集的试验材料(15种野生石斛和1种栽培石斛)还相对较少。同时,该试验从70条UBC引物中仅仅筛选出6条条带清晰、多态性好的引物用于ISSR扩增,这些都对不同石斛种间亲缘关系的准确鉴定具有一定程度的影响。在今后的研究中,既要方法上综合植物形态学、不同类型的多种分子标记以及细胞学等方面的研究,又要兼顾不同技术特点的电泳技术,充分利用其特点与优势,不断提高石斛属植物遗传多样性与亲缘关系的研究水平。

参考文献

- [1] 徐琼,陈素红,吕圭源. 3种不同石斛的化学成分及相关药理学研究进展[J]. 亚太传统医药,2010,6(4):115-118.
- [2] 胡之壁. 中药现代生物技术[M]. 北京:人民出版社,2009:97-100.
- [3] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, 81(24): 8014-8018.
- [4] 赵树进. 中药材生物多样性及核酸分析技术[M]. 北京:科学出版社, 2009:64-70.
- [5] 吉占和,陈心启,罗毅波,等. 中国植物志[M]. 19卷. 北京:科学出版社,1999:67-257.
- [6] 任羽,杨光穗,尹俊梅,等. 石斛种质资源遗传多样性的RAPD分析[J]. 热带农业科学,2007,23(6):598-600.

PAGE Analysis of Genetic Diversity of *Dendrobium* Germplasm Resources

ZHANG Wen-long^{1,2}

(1. Pharmacy Department, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002; 2. Institute of Upland Food Crops, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: Taking 16 *Dendrobium* germplasm resources as experimental materials, using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) methods, effect of difference of low molecular weight bands on plant taxonomy for *Dendrobium* were studied by 6 ISSR primers screened. The results showed that the results of the experiment was basically similar to the classical morphological classification. But there were some difference between both methods. PAGE method had high polymorphism ratio and could be used to further reveal genetic diversity and relationship of *Dendrobium* at the molecular level.

Key words: *Dendrobium*; ISSR; PAGE