

DOI:10.11937/bfyy.201623023

不同产地人参种质资源 RAPD 和 SSR 分析

侯志芳¹, 孟露露², 许世泉¹, 王英平¹, 雷秀娟¹, 郑培和¹

(1. 中国农业科学院 特产研究所, 吉林 长春 130112; 2. 吉林省现代中药及生物制药基地建设办公室, 吉林 长春 130112)

摘 要:以 15 个产地人参种质资源为试材, 采用 RAPD 和 SSR 分子标记技术对其遗传多样性进行分析。结果表明: 2 种分子标记均能揭示不同地区人参种质间的遗传多样性。共筛选出 11 条 RAPD 随机引物, 平均每条引物可扩增出 3~17 条 DNA 片段, 共扩增出 104 条清晰条带, 多态性条带 100 条, 多态性百分率为 96.15%, 揭示供试材料间遗传相似系数(GS)为 0.505 3~0.989 5, 平均值为 0.760 4。筛选出 5 对 SSR 引物, 平均每对引物可扩增出 1~8 条 DNA 片段, 共扩增出 38 条清晰条带, 多态性条带 35 条, 多态性百分率为 92.11%, 揭示供试材料间遗传相似系数(GS)为 0.400 0~0.960 0, 平均值为 0.742 1。RAPD 和 SSR 标记的聚类分析在分类上稍有差异, 但总体趋势一致, RAPD、SSR 及 RAPD+SSR 均将样品聚为三大类, 均能揭示它们之间的亲缘关系, 为人参种质资源的收集与利用奠定了基础。

关键词:人参; RAPD; SSR; 遗传多样性

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)23-0096-06

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)属五加科多年生宿根草本, 是闻名遐迩的“东北三宝”之一, 也是我国名贵中药材之一, 有“百草之王”的美称。我国人参产区多集中在东北三省, 其中吉林省为主要产区, 其产量占全国的 85%, 占世界产量的 70%, 居世界之首^[1]。然而近年来, 栽培人参品质下降、品种混乱, 人参种质资源破坏严重, 亟需构建人参种质基因库, 收集和整理人参宝贵的种质资源^[2]。课题组认为不同产地人参资源在遗传

多样性及亲缘关系上存在一定的相关性, 这对人参品种的选育和人参种质资源合理开发和保护都有重要意义。

人参生长周期长、繁殖速度慢, 很难用常规育种的方法来研究人参种质资源。分子标记技术由于其简便、快捷、稳定、不受环境限制等优点, 自问世以来一直备受学者青睐。1990 年, WILLIAMS 等^[3]和 WELSH 等^[4]报道了一种较为简便的检测 DNA 多态性的技术, 即随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)。目前, 该技术已经成功应用在人参种质遗传多样性上, 1997 年冯斗等^[5]应用 RAPD 方法对不同的人参品种进行了鉴定, 首次获得了人参的 DNA 特异性扩增片段; 2005 年任跃英等^[6]采用 RAPD 法对黄果及红果人参、西洋参的种源关系进行分析; 2013 年 SCHLAG 等^[7]使用 RAPD 标记研究了西洋参品种间的遗传多样性。简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 也称

第一作者简介:侯志芳(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价。E-mail:18243081801@163.com.

责任作者:郑培和(1973-), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 现主要从事药用植物资源评价等研究工作。E-mail:zhengpeihe@caas.cn.

基金项目:国家国际科技合作专项资助项目(2015DFA31290)。

收稿日期:2016-08-04

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for Walnut in Qinghai

LIU Baoyao^{1,2}, LIU Xiaoli², WEI Haibin², GU Wenyi²

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. Qinghai Forestry Research Institute/Qinghai Plateau Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: The orthogonal design was used to optimize the main factors of ISSR-PCR amplification system for walnut in Qinghai. The results showed that in 20 μ L reaction system, the optimal PCR mixture contained 0.45 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.5 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 1.75 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺, 0.75 U Taq polymerase and 80 ng DNA.

Keywords: Qinghai; local walnut; ISSR-PCR

作微卫星 DNA,是基因组中广泛分布的 1~6 个核苷酸组成的基本单位多次重复形成一段 DNA,基于此而开发了 SSR 分子标记技术^[8]。KIM 等^[9]使用 EST-SSR 开发了 19 个微卫星标记,成功分析了 9 个韩国品种间的遗传关系,并构建了这些品种间的系统发育关系和认证系统。CHOI 等^[10]应用 EST-SSR 标记评估了人参品种及其相关物种间的遗传多样性。但是把这 2 种分子标记结合来研究人参种质资源遗传多样性尚鲜有报道,因此,为了更好的探索人参种质资源间遗传多样性,该研究利用 RAPD 和 SSR 对国内外人参种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行了研究,以期为人参种质资源保存和品种选育提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试样品为 2015 年在不同地区收集的 4 年生人参鲜叶,所有样品均由中国农业科学院特产研究所许世泉副研究员鉴定。具体信息见表 1。

表 1 种质资源的收集

Table 1 Collection of germplasm resources

序号 Sequence number	地名 Place	缩写 Abbreviation
1	吉林省通化市集安市朱仙镇	ZX
2	吉林省白山市抚松县满江镇老岭林场	LL
3	吉林省白山市抚松县白溪林场	BX
4	吉林省通化市集安市台上镇板盆村 1	BC1
5	吉林省通化市集安市台上镇板盆村 2	BC2
6	吉林省白山市抚松县万良镇大方村	DF
7	吉林省白山市市长白朝鲜族自治县	CB
8	吉林省白山市市长白朝鲜族自治县宝泉山镇	BQS
9	吉林省白山市抚松县抚南林场	FN
10	吉林省白山市靖宇县濛江乡复兴村	FX
11	吉林省白山市靖宇县三道湖镇燕平村	YP
12	黑龙江省漠河县	HLJ
13	吉林省吉林市左家镇	ZJ
14	日本	J
15	韩国	K

主要仪器:PCR 扩增仪(LifeECO,杭州博日科技有限公司);高速低温离心机(X-30R,贝克曼库尔特商贸有限公司);电泳仪(JY-SPA/JY-SPAT,北京君意东方电泳设备有限公司);快速混匀器(XK80-A,江苏新康医疗器械有限公司);电子天平(ME1002,梅特勒-托利多仪器有限公司);摇床(WD-9405D,北京六一仪器厂);凝胶成像系统(Biorad GelDoc XR,上海旦鼎国际贸易有限公司);超微量紫外可见分光光度计(0SE-260,天根生化科技有限公司)。

试验 PCR 所有试剂、RAPD 和 SSR 引物购自上海生工生物工程技术有限公司;DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 人参基因组 DNA 采用天

根试剂盒方法提取。取叶片 50 mg,液氮研磨后加 400 μ L 缓冲液 LP1 和 6 μ L RNase 漩涡振荡 1 min,室温放置 10 min;加 130 μ L 缓冲液 LP2,漩涡振荡 10 min;12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,将上清液移至新的离心管中;加 1.5 倍体积的 LP3,立即充分混匀 15 s,此时可能出现絮状沉淀;将上一步所得溶液和絮状沉淀加入一个吸附柱 CB3 中,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 s,倒掉废液;加 600 μ L 漂洗液 PW,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 30 s,倒掉废液,重复 1~2 次;12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 min,倒掉废液,室温放置数分钟晾干;将 CB3 转入一干净的离心管中,向吸附膜中悬空加 100 μ L(分 2 次)洗脱缓冲液 TE,室温放置 2~5 min,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。用超微量紫外可见分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的纯度与浓度。

1.2.2 RAPD-PCR 扩增 反应体系总体积 20 μ L,含有约 40 ng 基因组 DNA,2 μ L 引物(2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),2 μ L 10 \times PCR buffer 反应缓冲液,1.2 μ L MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),0.4 μ L dNTPs(2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each),1 U *Taq* 酶,用 DEPC 处理水补充体积至 20 μ L。另用 DEPC 处理水代替模板 DNA 作为阴性对照。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,38 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,38 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物使用 2%的琼脂糖凝胶电泳分离,电压 100 V,电泳 1 h,在凝胶成像仪上观察照相、记录。

1.2.3 SSR-PCR 扩增及电泳检测 反应体系总体积 20 μ L,含有约 40 ng 基因组 DNA,正向引物和反向引物各 2 μ L(2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),2 μ L 10 \times PCR buffer 反应缓冲液,1.2 μ L MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),0.4 μ L dNTPs (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each),1 U *Taq* 酶,用 DEPC 处理水补充体积至 20 μ L。另用 DEPC 处理水代替模板 DNA 作为阴性对照。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,35~38 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物在 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳下检测,电压 200 V,电泳 5 h,在凝胶成像仪上观察照相、记录。

1.3 数据分析

根据各分子在相同电泳迁移率(相同分子量片段)的有无,统计得到所有条带的二元数据,有 DNA 扩增条带记为 1,无带记为 0,利用 Ntsys 计算出遗传相似系数、构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 人参基因组 DNA 提取

由图 1 可知,提取的 DNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰,表明 DNA 质量满足后续试验的要求。



注:1~15. 样品名称与表 1 相同,下同。

Note:1-15. Sample names were the same as Table 1, the same below.

图 1 人参基因组 DNA 的电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis result of ginseng genomic DNA

2.2 引物扩增结果

随机选取合成的 30 条 RAPD 引物,筛选出条带清晰的 11 条(表 2)。11 条 RAPD 随机引物,平均每条引物可扩增出 3~17 条 DNA 片段,共扩增 104 条清晰条带,多态性条带 100 条,多态性百分率为 96.15%。RAPD 引物 S51 扩增结果见图 2。

表 2 RAPD 引物序列及扩增结果

Table 2 Sequences and amplification results of RAPD primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 Total bands
S1	GTTCGCTCC	5
S45	TGAGCGACA	13
S51	AGCGCCATTG	11
S66	GAACGGACTC	3
S87	GTCCCGACGA	5
S84	AGCGTGTCTG	17
S93	CTCTCCGCCA	9
S180	AAAGTGCGGC	16
S185	TTTGGGGCCT	4
S440	GGTGCTCCGT	13
S1183	GAGGTGTCTG	8

参考已报道的相关文献^[10-11]随机合成 10 对 SSR 引物,筛选出 5 对多态性和条带较为清晰的引物(表 3),平均每对引物可扩增出 3~13 条 DNA 片段,共扩增出 38 条清晰条带,多态性条带 35 条,多态性百分率为 92.11%。SSR 引物 GES19 扩增结果见图 3。

表 3 SSR 引物序列及扩增结果

Table 3 Sequences and amplification results of SSR primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 Total bands
PG281	GTAGTAGTAGTAAAACTTTGCTAACGGA ATTACAACTCTCTTCTTCTCTAC	13
GES19	GTACTATGGATAAAGCTGGAATGGA CGGTAAGTGACACTAAGAACAACCTG	11
gm129	AAGCAAGTTGATGGAATATATGAGC CAGTTTCTCTCTCTGGAATATCTA	3
gm175	CCTCAACATTATTTTCAGTCTCAGT TAGTGGTAGCAGCTTAGGAGGAGTA	4
gm184	TGGTTGACAAAGAAATTAACCAAT GACCAAAAAGATCCGTCGTAAAG	7

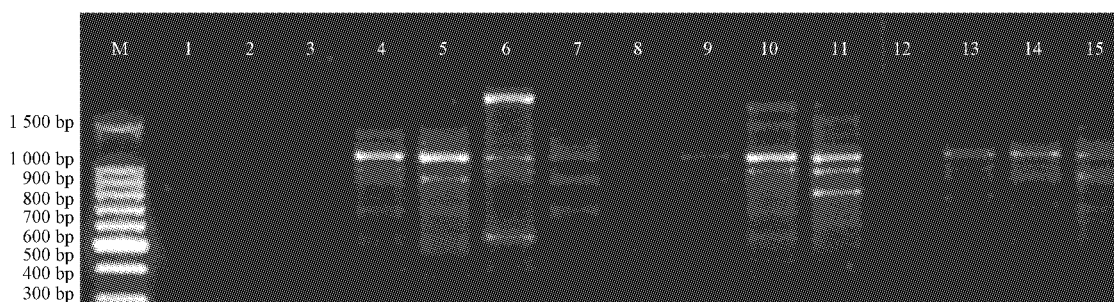


图 2 RAPD 引物 S51 的扩增结果

Fig. 2 Amplification result of RAPD primers S51

2.3 遗传相似性分析

利用 RAPD 标记扩增 DNA 片段,通过 Ntsys 计算出遗传相似系数(GS)。RAPD 标记揭示的 15 个地区人参资源间的遗传相似系数为 0.505 3~0.989 5(表 4),平均值为 0.760 4。其中通化市集安市朱仙镇(ZX)与白山市抚松县白溪林场(BX)、白山市长白朝鲜族自治县宝泉山镇(BQS)、黑龙江省(HLJ)以及白山市抚松县白溪林场

(BX)与白山市长白朝鲜族自治县宝泉山镇(BQS)的 GS 值最大,为 0.989 5;通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)与白山市抚松县万良镇大方村(DF)GS 最小,为 0.505 3。

SSR 标记揭示的 15 个地区人参资源间遗传相似系数(GS)为 0.400 0~0.960 0(表 5),平均值为 0.742 1。其中,白山市抚松县满江镇老岭林场(LL)与白山市抚松县白溪林场(BX)的 GS 值最大,为 0.960 0;通化市集安

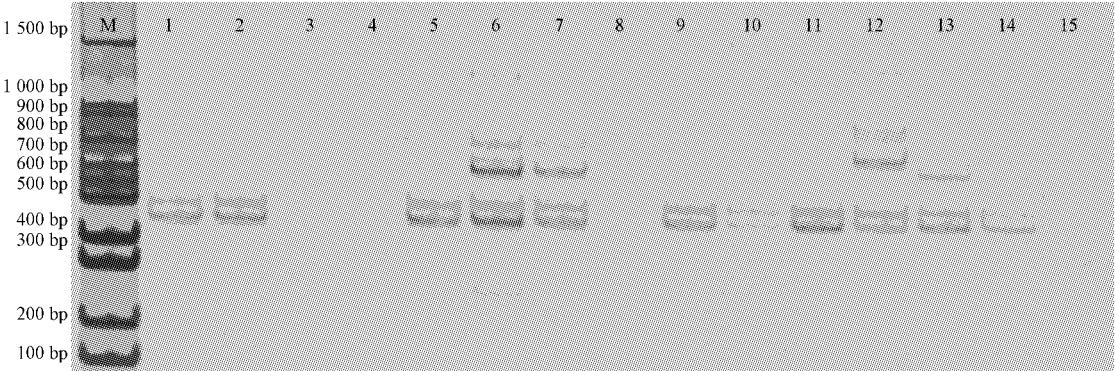


图3 SSR引物GES19的扩增结果

Fig.3 Amplification result of SSR primers GES19

表4 RAPD标记揭示的15个地区人参资源间遗传相似系数

Table 4 Genetic similarity coefficient among 15 kinds of *Panax ginseng* showed by RAPD marker

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.000 0														
2	0.915 8	1.000 0													
3	0.989 5	0.926 3	1.000 0												
4	0.600 0	0.663 2	0.610 5	1.000 0											
5	0.547 4	0.610 5	0.557 9	0.736 8	1.000 0										
6	0.600 0	0.663 2	0.610 5	0.557 9	0.505 3	1.000 0									
7	0.736 8	0.800 0	0.747 4	0.736 8	0.789 5	0.610 5	1.000 0								
8	1.000 0	0.915 8	0.989 5	0.600 0	0.547 4	0.600 0	0.736 8	1.000 0							
9	0.789 5	0.815 0	0.800 0	0.705 3	0.694 7	0.663 2	0.842 1	0.789 5	1.000 0						
10	0.536 8	0.600 0	0.547 4	0.536 8	0.536 8	0.684 2	0.642 1	0.536 8	0.642 1	1.000 0					
11	0.663 2	0.705 3	0.673 7	0.515 8	0.526 3	0.578 9	0.589 5	0.663 2	0.642 1	0.557 9	1.000 0				
12	0.989 5	0.905 3	0.978 9	0.589 5	0.536 8	0.589 5	0.726 3	0.989 5	0.778 9	0.547 4	0.673 7	1.000 0			
13	0.831 6	0.852 6	0.842 1	0.726 3	0.652 6	0.642 1	0.778 9	0.831 6	0.894 7	0.642 1	0.705 3	0.842 1	1.000 0		
14	0.631 6	0.652 6	0.642 1	0.589 5	0.642 1	0.484 2	0.789 5	0.631 6	0.736 8	0.578 9	0.547 4	0.642 1	0.736 8	1.000 0	
15	0.663 2	0.726 3	0.673 7	0.621 1	0.715 8	0.536 8	0.800 0	0.663 2	0.663 2	0.631 6	0.578 9	0.673 7	0.705 3	0.800 0	1.000 0

市台上镇板岔村 2(BC2)与白山市抚松县白溪林场(BX)的GS值最小,为0.400 0。

RAPD+SSR 结合揭示的遗传相似系数为 0.491 7~0.950 0(表 6),平均值为 0.756 9。其中,通化市集安市朱仙镇(ZX)与白山市抚松县白溪林场(BX)的GS最大,为0.950 0;通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)白山市抚松县万良镇大方村(DF)GS最小,为0.491 7。

从 RAPD 和 SSR 标记揭示的遗传相似系数来看,均揭示了白山市抚松县白溪参场(BX)与其他地区的人参材料间存有最大遗传相似系数,通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)和白山市长白朝鲜族自治县(CB)的人参材料间的遗传相似系数最小,说明 RAPD 和 SSR 标记所揭示的遗传相似系数数值变化趋势基本一致。

表5 SSR标记揭示的15个地区人参资源间遗传相似系数

Table 5 Genetic similarity coefficient among 15 kinds of *Panax ginseng* showed by SSR marker

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.000 0														
2	0.760 0	1.000 0													
3	0.800 0	0.960 0	1.000 0												
4	0.640 0	0.800 0	0.840 0	1.000 0											
5	0.520 0	0.440 0	0.400 0	0.560 0	1.000 0										
6	0.600 0	0.680 0	0.720 0	0.800 0	0.440 0	1.000 0									
7	0.800 0	0.880 0	0.920 0	0.840 0	0.480 0	0.800 0	1.000 0								
8	0.680 0	0.840 0	0.800 0	0.800 0	0.600 0	0.600 0	0.800 0	1.000 0							
9	0.640 0	0.720 0	0.760 0	0.760 0	0.480 0	0.720 0	0.840 0	0.800 0	1.000 0						
10	0.720 0	0.800 0	0.760 0	0.680 0	0.480 0	0.560 0	0.760 0	0.800 0	0.600 0	1.000 0					
11	0.720 0	0.800 0	0.840 0	0.760 0	0.400 0	0.800 0	0.920 0	0.720 0	0.920 0	0.680 0	1.000 0				
12	0.600 0	0.680 0	0.720 0	0.880 0	0.520 0	0.760 0	0.800 0	0.680 0	0.720 0	0.560 0	0.720 0	1.000 0			
13	0.680 0	0.600 0	0.560 0	0.480 0	0.840 0	0.440 0	0.640 0	0.600 0	0.480 0	0.640 0	0.560 0	0.440 0	1.000 0		
14	0.680 0	0.840 0	0.880 0	0.800 0	0.360 0	0.680 0	0.880 0	0.760 0	0.720 0	0.880 0	0.800 0	0.680 0	0.520 0	1.000 0	
15	0.640 0	0.560 0	0.520 0	0.680 0	0.720 0	0.560 0	0.600 0	0.720 0	0.600 0	0.680 0	0.520 0	0.640 0	0.560 0	0.560 0	1.000 0

表 6

RAPD+SSR 标记揭示的 15 个地区人参资源间遗传相似系数

Table 6 Genetic similarity coefficient among 15 kinds of *Panax ginseng* showed by RAPD+SSR marker

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.000 0														
2	0.883 3	1.000 0													
3	0.950 0	0.933 3	1.000 0												
4	0.608 3	0.691 7	0.658 3	1.000 0											
5	0.541 7	0.575 0	0.525 0	0.700 0	1.000 0										
6	0.600 0	0.666 7	0.633 3	0.608 3	0.491 7	1.000 0									
7	0.750 0	0.816 7	0.783 3	0.758 3	0.725 0	0.650 0	1.000 0								
8	0.933 3	0.900 0	0.950 0	0.641 7	0.558 3	0.600 0	0.750 0	1.000 0							
9	0.758 3	0.791 7	0.791 7	0.716 7	0.650 0	0.675 0	0.841 7	0.791 7	1.000 0						
10	0.575 0	0.641 7	0.591 7	0.566 7	0.525 0	0.658 3	0.666 7	0.591 7	0.633 3	1.000 0					
11	0.675 0	0.725 0	0.708 3	0.566 7	0.500 0	0.625 0	0.658 3	0.675 0	0.700 0	0.583 3	1.000 0				
12	0.908 3	0.858 3	0.925 0	0.650 0	0.533 3	0.625 0	0.741 7	0.925 0	0.766 7	0.550 0	0.683 3	1.000 0			
13	0.800 0	0.800 0	0.783 3	0.675 0	0.691 7	0.600 0	0.750 0	0.783 3	0.808 3	0.641 7	0.675 0	0.758 3	1.000 0		
14	0.641 7	0.691 7	0.691 7	0.633 3	0.583 3	0.525 0	0.808 3	0.658 3	0.733 3	0.641 7	0.600 0	0.650 0	0.691 7	1.000 0	
15	0.658 3	0.691 7	0.641 7	0.633 3	0.716 7	0.541 7	0.758 3	0.765 0	0.650 0	0.641 7	0.566 7	0.666 7	0.675 0	0.750 0	1.000 0

2.4 聚类结果分析

2.4.1 RAPD 聚类结果分析 由图 4A 可知,以 0.66 处相似系数为分界点,可以把 15 个地区的人参材料聚为三大类群,其中白山市抚松县万良镇大方村(DF)和白山市靖宇县(JY)人参资源聚为第 I 类,通化市集安市台上镇板岔村 1(BC1)和通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)

聚为第 II 类,剩余 11 个地区的人参资源聚为第 III 类;依据第 III 类所供试材料的遗传相似系数平均值 0.799 9 为阈值,可将它们分为 3 个亚类:白山市靖宇县三道湖镇燕平村(YP)单独聚为一亚类,白山市长白朝鲜族自治县(CB)、日本(J)、韩国(K)聚为一亚类,其余的聚为一亚类。

2.4.2 SSR 聚类结果分析 由图 4B 可知,以 0.66 处相似系数为分界点,15 个供试材料也聚为三大类,其中韩国(K)人参材料单独聚为第 I 类,说明与其他地区类型遗传差异较大,通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)和吉林市左家镇(ZJ)聚为第 II 类,剩余 12 个地区的人参资源聚为第 III 类。

2.4.3 RAPD 和 SSR 聚类结果分析 由图 4C 可知,在遗传相似系数为 0.66 处,白山市抚松县万良镇大方村(DF)和白山市靖宇县濛江乡复兴村(FX)人参资源聚为第 I 类,通化市集安市台上镇板岔村 1(BC1)和通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)聚为第 II 类,剩余 11 个地区的人参资源聚为第 III 类,与 RAPD 聚类结果一致;以第 III 类遗传相似系数的平均值 0.792 2 为阈值,其中白山市靖宇县三道湖镇燕平村(YP)和吉林市左家镇(ZJ)、日本(J)和韩国(K)分别单独聚类,白山市长白朝鲜族自治县(CB)和白山市抚松县抚南参场(FN)聚为一类,其余的聚为一类。

3 讨论

该试验利用 RAPD 和 SSR 2 种分子标记分析的结果并不完全一致,但总趋势大体一致,说明这 2 种分子标记均能揭示人参种质资源的遗传多样性和亲缘关系。应用 RAPD 和 SSR 标记得到的遗传相似系数以及聚类结果表明,韩国(K)和日本(J)材料单独聚为一类的概率较大,国内材料聚在一起的概率较大,说明国内材料同韩国、日本材料间亲缘关系较远;国内材料聚类也呈现一定的区域性,其中通化市集安市台上镇板岔村 1(BC1)和通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)优先聚为一类,这种遗传聚类的划分充分反映出亲缘关系与地理分布的相关性,即遗传聚类呈现一定的地域性^[12-15]。单看国内

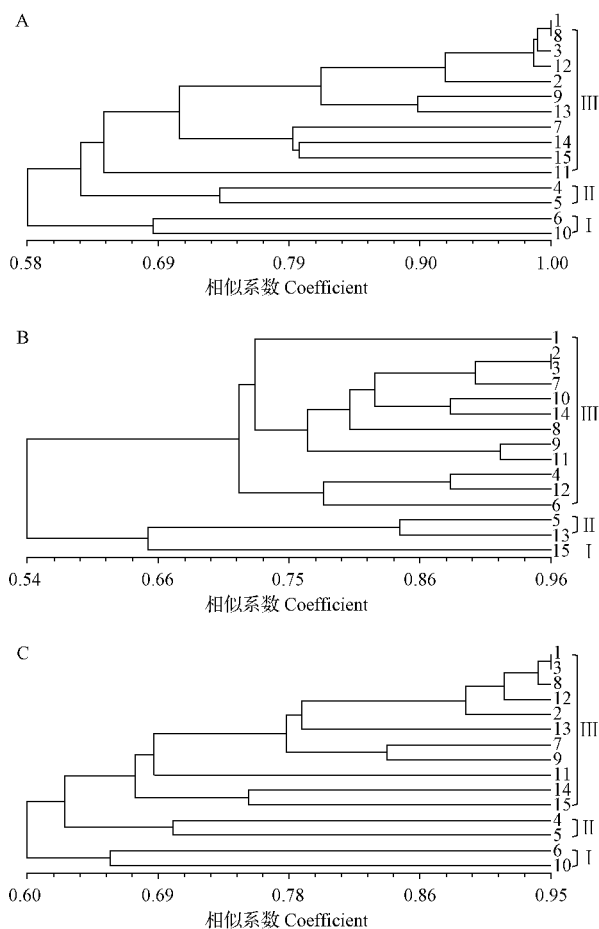


图 4 RAPD (A)、SSR (B)、RAPD+SSR (C)

标记的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis based on RAPD (A), SSR (B) and RAPD + SSR (C) markers

材料的聚类结果,即使来自同一地区的样品也并不总是聚在一起,说明同一地区的人参种质资源间也存在差异,这与栾树昆等^[16]研究的观点一致,这种差异可能是引种栽培造成的,主要由遗传因素决定。

从地理分布上来看,韩国(K)和日本(J)的人参种质资源与国内栽培种亲缘关系较远。国内除了通化市集安市台上镇板岔村 1(BC1)和通化市集安市台上镇板岔村 2(BC2)、白山市抚松县万良镇大方村(DF)和白山市靖宇县濛江乡复兴村(FX)人参资源优先聚为一类,其余没有明显的聚类趋势,这可能和农家种的选育有关,同时也说明我国人参种质资源较为丰富。根据人参农艺性状在异地栽培条件下进行准确的识别难度也较大,与杨广顺等^[17]观点一致。因此为了更加全面分析种质资源的变化,选育更加优质的种质资源,应充分利用分子水平间的遗传多样性分析,揭示它们之间的亲缘关系,为人参种质资源的引种栽培及育种奠定一定的理论基础,为人参种质资源的保存和利用提供更有力的理论支持和科学依据。

参考文献

- [1] 郑友兰,张崇禧,李向高. 吉林人参的质量评价指标与方法[J]. 人参研究,2001,13(2):12-14.
- [2] 杨成君. 人参 cDNA 文库构建,EST 与相关基因表达分析及 EST-SSR 标记建立[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2008.
- [3] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [5] 冯斗,吴子凯,陈荣基. RAPD 方法在人参鉴别上应用研究初报[J]. 广西农业大学学报,1997,16(3):210-214.
- [6] 任跃英,高巍,郭影,等. 黄果及红果人参、西洋参基因组的 RAPD 分子标记研究[J]. 吉林农业大学学报,2005,27(1):39-42.
- [7] SCHLAG E M, MCINTOSH M S. The relationship between genetic and chemotypic diversity in American ginseng (*Panax quinquefolius* L.)[J]. Phytochemistry, 2013, 93(1): 96-104.
- [8] TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [9] KIM N H, CHOI H I, AHN I O, et al. EST-SSR marker sets for practical authentication of all nine registered ginseng cultivars in Korea[J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(3): 298-307.
- [10] CHOI H I, KIM N H, KIM J H, et al. Development of reproducible EST-derived SSR markers and assessment of genetic diversity in *Panax* ginseng cultivars and related species[J]. Journal of Ginseng Research, 2011, 35(4): 399-412.
- [11] REUNOVA G D, KOREN O G, MUZAROK T I, et al. Microsatellite analysis of *Panax* ginseng, natural populations in Russia[J]. Chinese Medicine, 2014, 5(4): 231-243.
- [12] 喻景权,杜尧舜. 蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍问题[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(1):124-126.
- [13] 汪立刚,沈阿林,孙克刚,等. 大豆连作障碍及调控技术研究进展[J]. 土壤肥料,2001(5):3-8.
- [14] 毛志泉,王丽琴,沈向,等. 有机物料对平邑甜茶实生苗根系呼吸强度的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2004,10(2):171-175.
- [15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [16] 栾树昆,杨广顺,孙春玉,等. 吉林抚松人参遗传多样性的 SSR 分析[J]. 北方园艺,2012(15):133-136.
- [17] 杨广顺,王义,孙春玉,等. 人参遗传多样性的 SSR 分析[J]. 安徽农业科学,2010,38(13):6660-6662.

RAPD and SSR Analyses of Genetic Diversity of Ginseng Germplasm From Different Habitats

HOU Zhifang¹, MENG Lulu², XU Shiquan¹, WANG Yingping¹, LEI Xiujuan¹, ZHENG Peihe¹

(1. Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112; 2. Modern Chinese Medicine and Bio-pharmaceutical Bases in Jilin Province Office, Changchun, Jilin 130112)

Abstract: Taking ginseng germplasms from 15 regions as materials, the genetic diversity of ginseng (*Panax ginseng* C. A Meyer) produced in 15 regions was analyzed by using RAPD and SSR. The results showed that two kinds of molecular markers could reveal the genetic diversity among different regions. In this paper, 11 random RAPD primers were selected, each primer could amplify 3—17 DNA fragments, eleven RAPD primers had amplified 104 clear bands, 100 polymorphic bands, and the percentage of polymorphism was 96.15%. RAPD revealed for the test between genetic similarity coefficient (GS) was 0.505 3—0.989 5, average of 0.760 4. Selected five pairs of SSR primers, per pair of primers could amplify DNA fragments from one to eight, a total of 38 clear amplified bands, 35 polymorphic bands, percentage of polymorphism was 92.11%, the test revealed the genetic similarity coefficient (GS) was 0.400 0—0.960 0, average of 0.742 1. RAPD and SSR markers constructed cluster diagram was little difference in classification, but the overall trend was consistent. The samples were integrated into three categories by RAPD, SSR and RAPD+SSR, respectively. It could reveal the relationships among them, and laid the theoretical foundation for the introduction and cultivation and breeding of ginseng germplasm.

Keywords: ginseng; RAPD; SSR; genetic diversity