

吉林抚松人参遗传多样性的 SSR 分析

栾树昆, 杨广顺, 孙春玉, 张美萍, 王 义

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:利用 SSR 技术对吉林省抚松地区的 78 份人参样品进行了亲缘关系分析研究。结果表明:同一地区的人参种质资源也存在较大差异,这一差异主要是由其遗传因素决定的;25 对引物共扩增 227 条带,其中多态性的条带 206 条,多态性 90.75%。

关键词:人参;遗传关系;SSR 分析

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0133-04

人参(*Panax ginseng* C A Mey)属五加科(Araliaceae)多年生草本植物,是我国传统中药材之一,历来被视为百草之王。吉林省是我国人参的主要产区,产量占全国的 85%,占世界产量的 70%,居世界之首^[1]。随着时间的推移和自然、人工的选育,人参已经形成了许多具有稳定性状的农家品种,但由于受其特殊的生长条件和生长周期的影响,人参出现了许多不同的农艺性状,造

成了不同品种间的准确辨别难度较大,人参类型间的遗传背景也不明确。

随着分子标记技术的不断发展,越来越多的学者开展了人参种质资源亲缘关系、遗传多样性等方面的研究。赵寿经等^[2]在对人参农家类型农艺性状的遗传分析研究中发现,几种人参的亲缘关系以及不同农家品种人参的产量与遗传因素有关,李欣等^[3]用 RAPD 技术研究发现,人参各品系内的遗传多样性存在较大差别;马小军等^[4]用 RAPD 技术对 5 个人参农家类型共 40 个个体进行了遗传多样性检测;杨广顺等^[5]利用 SSR 分子标记技术对 9 种人参类型进行了遗传多样性分析,分析了吉林省 5 个人参产区人参种质资源存在的差异性,但还未见有关吉林省人参遗传背景的详细报道。该试验利用 SSR 分子标记技术对吉林省主要人参产区之一抚松

第一作者简介:栾树昆(1986-),男,硕士,研究方向为植物分子生物学与基因工程。

责任作者:王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,现主要从事植物分子生物学与基因工程的教学与科研工作。

基金项目:吉林省科学厅科研资助项目(200905107)。

收稿日期:2012-05-07

参考文献

- [1] 田新平. 培养基污染防治方法研究[J]. 现代农业科技, 2010(13):11-13.
[2] 于福科, 张广军. 玫瑰组织培养污染控制技术措施[J]. 陕西农业科学, 2002(11):47-48.

[3] 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003(23):41-47.

[4] 许婉芳, 龚福生, 萧华山. 杀菌剂对金线莲组织培养中微生物污染的抑制作用[J]. 福建果树, 1999(4):6-7.

Research on the Prevention of Tissue Culture Seedling Pollution by Mercuric Chloride

PENG Guang-lin, YU Yong-mei, XUE Yuan-xia, ZHANG Zhi-fen, SHI Shu-yi
(Institute of Yantai, China Agricultural University, Yantai, Shandong 264670)

Abstract: Chosen hemerocallis and cut chrysanthemum seedlings as materials, mercuric chloride at the rate of 0.005, 0.010, 0.030, 0.050 and 0.070 mg/L was added into culture medium, respectively, the effects of mercuric chloride on the pollution prevention of tissue culture seedling were studied. The results showed that mercuric chloride could significantly eliminate pollution at 0.010 mg/L concentration by 2 to 3 switches. As mercuric chloride contents were between 0.030 and 0.070 mg/L, the pollution was markedly inhibited and a positive relationship was found between inhibition effect and concentrations. 0.080 mg/L mercuric chloride was unfavorable for tissue culture seedlings indicted by leaf chlorosis and plant death. It was concluded that concentrations between 0.030 and 0.070 mg/L may be the better choice to prevent pollution for hemerocallis and cut chrysanthemum seedlings.

Key words: polluted tissue culture seedling; mercuric chloride; clear pollution

地区的人参样品进行详细研究,明确同一地区人参品种间的遗传差异和亲缘关系,为进一步进行人参育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用 78 份人参农家品种选自吉林省抚松县北岗镇等 7 个乡镇,14 个村,基本囊括了抚松地区所有人参农家品种。人参样品的详细信息见表 1,其中 r 代表人参,数字 1~78 代表 78 份人参样品。试验共用引物 25 对,引物设计参考杨成军等^[6]关于人参 EST-SSR 的研究报道,由北京华大基因合成,表 2 为引物序列的详细信息。

表 1 人参种质名称及产地

Table 1 Ginseng material					
序号	地点	序号	地点	序号	地点
r1	北岗镇胜利村 1	r27	兴参乡大阳岔村 6	r53	兴参乡平安村 6
r2	北岗镇胜利村 2	r28	北岗镇大顶子村 3	r54	东港镇西南岔村 2
r3	黄泥镇大东村 1	r29	兴参乡大阳岔村 7	r55	东港镇西南岔村 3
r4	黄泥镇大东村 2	r30	兴参乡平安村 1	r56	露水镇高丽浦村 1
r5	兴参乡大阳岔村 1	r31	北岗镇大顶子村 4	r57	露水镇高丽浦村 2
r6	北岗镇胜利村 3	r32	北岗镇浦春河村 1	r58	露水镇高丽浦村 3
r7	黄泥镇大东村 3	r33	北岗镇浦春河村 2	r59	露水镇高丽浦村 4
r8	黄泥镇大东村 4	r34	黄泥镇西川村 3	r60	泉阳镇泉水村 6
r9	北岗镇胜利村 4	r35	黄泥镇西川村 4	r61	泉阳镇泉水村 7
r10	黄泥镇大东村 5	r36	东岗镇前川村 3	r62	泉阳镇泉水村 8
r11	兴参乡大阳岔村 2	r37	兴参乡平安村 2	r63	东港镇西南岔村 4
r12	东岗镇前川村 1	r38	泉阳镇泉水村 2	r64	东港镇西南岔村 5
r13	兴参乡大阳岔村 3	r39	露水镇清水河村 4	r65	兴参乡平安村 7
r14	兴参乡大阳岔村 4	r40	露水镇清水河村 5	r66	泉阳镇泉水村 9
r15	东岗镇前川村 2	r41	东岗镇前川村 4	r67	东港镇西南岔村 6
r16	北岗镇胜利村 5	r42	兴参乡平安村 3	r68	露水镇高丽浦村 5
r17	露水镇清水河村 1	r43	兴参乡平安村 4	r69	兴参乡平安村 8
r18	泉阳镇泉水村 1	r44	东岗镇前川村 5	r70	东港镇西南岔村 7
r19	黄泥镇西川村 1	r45	兴参乡平安村 5	r71	泉阳镇泉阳河村 1
r20	黄泥镇西川村 2	r46	泉阳镇泉水村 3	r72	泉阳镇泉阳河村 2
r21	北岗镇大顶子村 1	r47	泉阳镇泉水村 4	r73	露水镇参场村 1
r22	东岗镇前川村 3	r48	露水镇清水河村 6	r74	露水镇参场村 2
r23	兴参乡大阳岔村 5	r49	东岗镇前川村 6	r75	露水镇参场村 3
r24	露水镇清水河村 2	r50	泉阳镇泉水村 5	r76	东港镇西南岔村 8
r25	露水镇清水河村 3	r51	露水镇清水河村 7	r77	东港镇西南岔村 9
r26	北岗镇大顶子村 2	r52	东港镇西南岔村 1	r78	泉阳镇泉阳河村 3

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 人参 DNA 的提取采用改进后的 CTAB 法^[7],所得样品 DNA 用 40 μ L ddH₂O 回溶,吸取 5 μ L 电泳检测其质量。

1.2.2 SSR 扩增 SSR 扩增体系采用 10 μ L 体系,反应在 Gene Amp PCR System 9700 上进行,反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,合适的退火温度

表 2 SSR 引物

Table 2 SSR primers		等位	多态位	多态百分率
引物	引物序列(5' to 3')	位点	点数	/ %
P1	GAATCGAAGTGTAAAGTTGAT CTTAAATCGATGATAACACC	10	9	90.0
P2	CATTACATACTACTCTCCAC GTTGGAGATTAATGTATAGATA	11	10	90.9
P3	ATGAGAAGAGTGAGTAGATGATTA TCTCTCATATCATCAATAACATCA	9	9	100
P4	GTGATAACATTCAATAAGAAAGTG GATGGAACGTATCTATGTACAGTC	10	9	90.0
P5	AATCAGAAACAAAGAAAGCTAAAC CTCTCTCATCTCTCTCTCTTC	8	8	100
P6	CCAATCAACTCAGTATGTGTCAT GGGATATAAGTGCAATGTAAITC	9	9	100
P7	GTGGGACTGGTATACAATAAGA GTGTTCTTAGTTGCCATTG	10	9	90.0
P8	CTACACGCTTTTTCATAGCTTACA TGTCTGCATAAAAGAGTTTCGAGGC	11	10	90.9
P9	CATTAAATACAAACCCCTTCTTC TTGGGTGTAATGTAATATAGCTCTG	9	8	88.9
P10	GTAGTAGTAGTAAACCTTGTCTAACG ATTACAACCTCTCTCTCTCTCTAC	9	9	100
P11	ACTCAAAATCTACAGCTTCCTC GATACCCAGGCGAGCTGTGATGAC	8	7	87.5
P12	GTAAGGAAGAAGCTCCTTAACAG CCCCAATTAACCTATTCCTTATC	6	6	100
P13	CTGTCTATGCAAGTTGCGGCTG ATCAAGTTGGAATCAGGTGGG	10	9	90.0
P14	GCAACTCCAGGCATAGAAAAATAC CACACCAACGGCACTTCAGC	10	10	100
P15	TATGGAAGACACACCTGCA GTAAACTAGCAGTAAGGGGCTC	9	9	100
P16	GCAACATACAACAGCAACAACC CCCTTGGTCAATGATGTACAGG	9	7	77.8
P17	GTTGGATGAACCTGAGCAAAAG GAACGGGACAAGCCAACTAGG	10	9	90.0
P18	CATTTTAACTGTTGCAAGGCGATC TGTGTGTTTAAATCTCAGTCCCAC	8	8	100
P19	CTGGCATCGAAGTTTCTCCATTC TGCATAGCACAGAGAGGAGG	8	7	87.5
P20	CAGAAATTAAGTGGAGGAGGAG AGCAAAAGCACAGCCACAGCC	9	9	100
P21	AGAGACAAAGTGAAGCACCACCG AATACGTGCATTACAGGCAATCACG	9	8	88.9
P22	CCAGCCAAATGAGGTGTACTTTG CGGAGTATCTTTCTCTTCTCTCTC	8	6	75.0
P23	GGAGGTGATTGATGTAGTGAATCC GGCTCTCTCTATACTCACTATTCCC	10	8	80.0
P24	GCAATGAACGATACACCTTGAGG GGTATGCACCAGAAACGAGCTGG	8	6	75.0
P25	ACTACCGGAGTCAAGCCTCA ACGGCCATCATTAATCCAAA	9	7	77.8

1 min,72℃延伸 90 s,30 次循环;72℃延伸 7 min,4℃保存。各对引物的最适温度通过梯度 PCR 结果而定,对 PCR 产物通过 3%的琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色并观察拍照。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果

25 对引物对 78 个人参样品进行 PCR 扩增,共在 227 个位点上扩增出条带,平均每对引物有 9.08 个扩增位点,每对引物可以检测到等位位点的个数从 6~11 个不等,其中多态性位点 206 个,多态率为 90.75%。图 1 为引物 P23 对部分人参材料的 DNA 扩增结果,可以看出,不同供试材料的主谱带基本一致,说明它们的遗传背景有很大相似性。

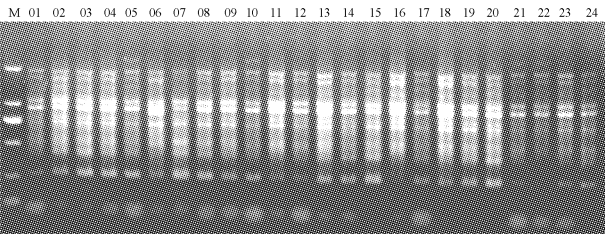


图1 引物 P23 扩增前 24 个人参材料的 DNA 电泳结果
Fig. 1 Amplification of primer P23 in 24 materials of ginseng

2.2 遗传相似系数分析

根据各分子标记在相同电泳迁移率(相同分子量片

段)的有无,统计得到所有位点的二元数据,有 DNA 扩增带记为 1,无带记为 0,利用 Ntsys 计算出遗传相似系数。由图 2 可知,同一地区人参间的遗传相似系数也有较大的差异,78 份人参样品间的相似系数范围在 0.5200~1.0000。其中 r68 与 r32 的遗传相似系数最小,为 0.5200,说明 2 种人参的亲缘关系较远。遗传相似系数最大的为 1.0000 的较多,可分为 6 组,r19、r20、r21、r23、r24、r25、r28、r29、r35、r42 为Ⅰ组,r3、r11、r17、r26、r63、r71 为Ⅱ组,r49、r22、r62 为Ⅲ组,r51、r10 为Ⅳ组,r57、r37 为Ⅴ组,r55、r69 为Ⅵ组。从地理位置上分析,这 6 组样品均来自不同村镇,没有明显的集中性。

Rows\Cols	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	r10
r1	1.0000000									
r2	0.6600000	1.0000000								
r3	0.6400000	0.8400000	1.0000000							
r4	0.7600000	0.8400000	0.9200000	1.0000000						
r5	0.8000000	0.7200000	0.8000000	0.8000000	1.0000000					
r6	0.8400000	0.7600000	0.9200000	0.8400000	0.7200000	1.0000000				
r7	0.8000000	0.8000000	0.8800000	0.8800000	0.8400000	0.8800000	1.0000000			
r8	0.8400000	0.6800000	0.8400000	0.8400000	0.8800000	0.7600000	0.8000000	1.0000000		
r9	0.8400000	0.6000000	0.7600000	0.6800000	0.7200000	0.6800000	0.6400000	0.7600000	1.0000000	
r10	0.8000000	0.8000000	0.9600000	0.8800000	0.8400000	0.8800000	0.9200000	0.8800000	0.7200000	1.0000000

图 2 部分人参类型基因间相异系数矩阵

Fig. 2 Dissimilarity coefficient matrix between genes of the ginseng types

2.3 聚类分析结果

由图 3 聚类分析可以看出,抚松地区的人参聚类有些复杂,有许多单个品种聚为 1 类,在遗传距离大约 0.71 处,r36 被单独分为 1 类。在遗传距离大约 0.73 处,r32 被单独分为 1 类。在遗传距离大约 0.745 处,r9 和 r53 被单独分为 1 类,在遗传距离大约 0.77 处,r45 和

r64 被单独分为 1 类。在遗传距离大约 0.78 处,r48 被单独分为 1 类,其它品种大致被分为 2 类。在遗传距离大约 0.884 处,分出了亲缘关系相近的 2 个族群,数量占到所有样品数的一半,从地理位置上分析,这 2 大族群中的样品均来自不同的村镇,并没有明显的集中性。

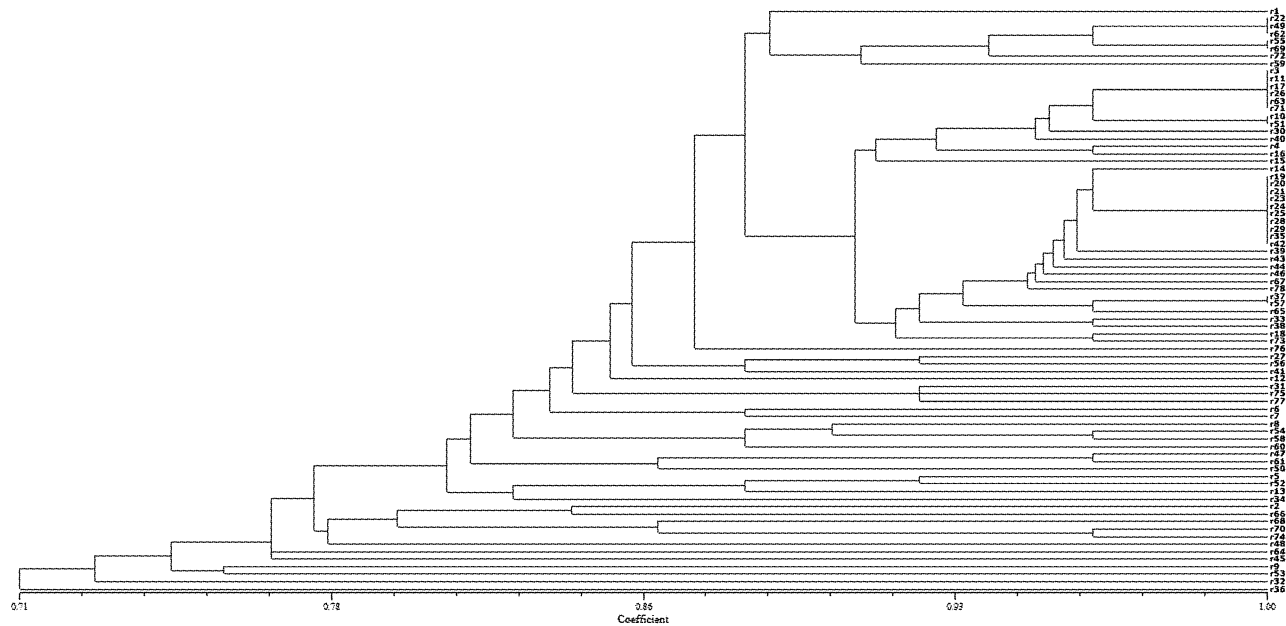


图 3 78 个类型的聚类图分析

Fig. 3 Dendrograms of 78 materials clustered analysis

3 结论与讨论

人参是我国主要的中药材之一,食用历史悠久,深受广大群众喜爱。因此,对人参品种进行鉴定显得尤为重要。该试验利用 25 对引物对抚松地区 78 份人参样品进行遗传多样性分析,结果多态性在 90.75%。说明同一地区人参品种间也有较丰富的多态性,这与李靖等^[8]对人参品种的遗传多样性研究结果相符。在遗传相似系数分析中,有 6 组样品间的相似系数为 1.0000,说明有可能这 6 组样品的种源来自同一地区,之间的亲缘关系极为接近,该试验所使用的引物并没有把这几种样品彻底分开,要解决这一问题,应加大引物量或者使用分辨率更高的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行进一步分析。

从聚类分析树状图可以看出,即使是来自同一地区的人参样品,聚类也比较复杂,人参在我国有悠久的栽培历史,且经过长时间的衍变,形成了多种优良品种和特有的农家品种,往往单独 1 个或者 2 个样品就聚为 1 类,说明这些样品的种源可能来自其它地区,彼此亲缘关系较远,或者是自己特有的农家品种。但在遗传距离大约 0.884 处,还是有一半数量的人参样品被分为亲缘关系相近的二大族群,这二大族群有可能是源于同一种源,经过长时间的种植衍化,形成了抚松地区特有的农家品种。

从地理位置上分析,相似系数为 1.0000 的 6 组样品和遗传距离相近的二大族群都没有明显的聚集趋势,说明抚松地区的人参选种比较混乱,并没有形成固定的区域划分,很可能是当地参农选种时相互选取造成的。该试验所用的人参样品均来自吉林省抚松地区,在一定程度上反应出了抚松地区内的人参亲缘关系,也为以后研究抚松地区人参品种的选育和其它地区人参遗传多样性提供了依据。

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):13-15.
- [2] 赵寿经,王荣生. 人参主要农艺性状的遗传相关和选择响应[J]. 中草药,1992,23(1):42.
- [3] 李欣,邵爱娟,黄璐琦,等. 人参选育品系的遗传变异研究[J]. 中国药杂志,2005(15):19-21.
- [4] 马小军. 人参农家类型的 RAPD 指纹研究[A]. 中药鉴定研究[M]. 北京:科学出版社,2001:103-106.
- [5] 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(3):46-48,68.
- [6] 杨成君,王军. 人参 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 植物生理学通讯,2008(1):69.
- [7] 刘玉皎,李萍,张小田,等. β -巯基乙醇和 PVP 对蚕豆 DNA 质量的影响[J]. 湖北农业科学,2008(3):11-13.
- [8] 李靖,程舟,杨晓伶,等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中草药,2008(9):1392-1395.

SSR Analysis on Genetic Diversity of Jilin Fusong *Panax ginseng*

LUAN Shu-kun, YANG Guang-shun, SUN Chun-yu, ZHANG Mei-ping, WANG Yi
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Genetic relationship in 78 materials of ginseng which came from Jilin Fusong were measured by using polymerase chain reaction (PCR) with SSR marker. The results showed that 227 alleles and 206 polymorphic were amplified by using 25 pairs of primers, and polymorphic percentage of amplified was 90.75%; there actually existed much genetic diversity at the same area of ginseng germplasm resources, the differences between the tested ginseng varietal types were related to the genetic factors.

Key words: *Panax ginseng*; genetic relationship; SSR analysis