

## # 药材与资源 #

## ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析

张春平<sup>1</sup>, 何平<sup>1\*</sup>, 何俊星<sup>1</sup>, 类淑桐<sup>1</sup>, 胡世俊<sup>2\*</sup>

(1 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

**摘要:**目的 对野生金荞麦进行遗传多样性研究。方法 通过 ISSR 技术对 8 个野生金荞麦居群的共 92 个个体进行遗传多样性分析。结果 用 12 个随机引物共扩增出 103 条清晰条带, 其中 90 条具多态性, 平均多态性位点比率为 87.38%, Nei's 基因多样性指数  $H = 0.3747$ , Shannon 多样性指数  $I = 0.5728$ , 遗传分化指数  $G_{st} = 0.1718$ 。遗传距离和遗传一致度分别为: 0.0431~0.3849 和 0.6843~0.9545。结论 金荞麦种内具有较高的遗传多样性, 遗传变异主要存在于居群内部, 遗传多样性与地理关系表现出明显的相关性。ISSR 可以作为研究遗传多样性及遗传分化的有效标记。

**关键词:** 金荞麦; 遗传多样性; ISSR; 聚类分析; 遗传分化

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1519-02

ISSR Analysis on genetic diversity of *Fagopyrum cymosum* collected from eight wild populationsZHANG Chunping<sup>1</sup>, HE Ping<sup>1</sup>, HE Junxing<sup>1</sup>, LEI Shutong<sup>1</sup>, HU Shijun<sup>2</sup>

(1 Key Laboratory of Environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research for Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**Abstract:** Objective To discuss the genetic diversity of *Fagopyrum cymosum*. Methods The genetic diversity of 92 individuals from eight populations were analyzed by ISSR marker. Results Twelve primers were selected to produce highly reproducible ISSR bands. Among 103 amplified bands, 90 showed polymorphism, the percentage of polymorphic bands reached 87.38%. Nei's gene diversity index ( $H$ ) was 0.3747, Shannon information index ( $I$ ) was 0.5728,  $G_{st}$  was 0.1718. The genetic distance coefficient and the genetic similarity were 0.0431~0.3849 and 0.6843~0.9545, respectively. Conclusion *F. cymosum* has high genetic diversity and the majority of genetic variation occur in the populations. By cluster analysis, the geographical distribution is very obvious. The ISSR marker can be used for the analysis of the genetic diversity and genetic variation of *F. cymosum*.

**Key words:** *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn.; genetic diversity; ISSR; cluster analysis; genetic variation

金荞麦 *Fagopyrum cymosum* (Trev.) Meisn. 亦称野荞麦、天荞麦、红三七, 系蓼科荞麦属植物, 是中国荞麦属野生种类中分布最广的一种, 大多生长在海拔 500~3000 m 的林缘、灌木丛、田边道旁及阴湿瘠薄的山地。在我国, 从大巴山以南到中国南部均有分布, 在重庆市主要分布于万州、南川、涪陵、黔江地区<sup>[1]</sup>。金荞麦根茎入药, 具有清热解毒、排脓

祛瘀的功效, 主要用于肺脓疡、麻疹肺炎、扁桃体脓肿等症<sup>[23]</sup>。另外, 金荞麦籽粒还具有很高的营养价值, 其蛋白质量丰富, 同时还含有具有保健疗效的多种矿物质元素和维生素, 具有软化血管, 降低人体血脂和胆固醇, 防老抗衰的作用<sup>[4]</sup>。目前, 对金荞麦的研究主要集中在化学成分、药理作用和临床应用等方面<sup>[5]</sup>。赵佐成等<sup>[6]</sup>采用等位酶技术对中国苦荞麦

\* 收稿日期: 2009-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070080)

作者简介: 张春平(1982), 男, 博士, 山东潍坊人, 主要从事植物资源学与植物分子生物学方面的研究。

E-mail: chunpingzhang520@163.com

\* 通讯作者: 何平 Tel: (023) 68254122 E-mail: heping196373@126.com

及其近缘种的遗传多样性进行了研究, 但是对金荞麦遗传多样性未做系统的研究。

ISSR(inter-simple sequence repeat) 由 Zietkiewicz 等<sup>[7]</sup>于 1994 年创建, 是建立在 PCR 反应基础上的 DNA 分子标记。近年来, ISSR2PCR 已成功用于植物遗传多样性分析、基因图谱绘制、分子生态学研究<sup>[8-15]</sup>、品种鉴定和种质资源的遗传多样性研究等领域<sup>[16-18]</sup>。该技术无需预知受试基因组序列, 具有成本低、操作简单、灵敏度高且重复性好等优点, 被认为是非常理想的分子标记。本实验首次运用 ISSR2PCR 技术对 8 个野生金荞麦居群的 92 个个体进行分析,

表 1 用于 ISSR 分析的不同居群的金荞麦

Table 1 ISSR Analysis of *F. cymosum* in different populations

编号	产地	样本数	居群状况	编号	产地	样本数	居群状况
QJFJ	黔江冯家镇 1	12	野生	NCSH	南川石河子	12	野生
QJFZ	黔江冯家镇 2	12	野生	NCHC	南川黄草坪	10	野生
QJZY	黔江正阳镇	12	野生	YYHX	酉阳后溪镇	12	野生
BBJY	北碚缙云山	12	野生	YYZD	酉阳钟多镇	10	野生

1.2 基因组 DNA 的提取: 本实验中采用改良后的 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取金荞麦的基因组 DNA, 所提 DNA 先用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 染色后拍照, 选择带型清晰、无拖尾的作为备用, 然后再在核酸蛋白分析仪上测其原始浓度, 最后统一稀释至 40 ng/LL, 供 ISSR2PCR 实验用。

表 2 12 个引物序列

Table 2 Sequence of 12 primers

引物编号	序列	实际退火温度/ e	引物编号	序列	实际退火温度/ e
UBC807	(AG) <sub>8</sub> T	53.0	UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT	57.5
UBC815	(CA) <sub>8</sub> C	55.0	UBC840	(GA) <sub>8</sub> YT	53.5
UBC818	(CA) <sub>8</sub> G	55.0	UBC847	(GA) <sub>8</sub> RC	57.5
UBC822	(TC) <sub>8</sub> A	52.5	UBC848	(CA) <sub>8</sub> RG	57.5
UBC823	(TC) <sub>8</sub> C	54.5	UBC855	(CA) <sub>8</sub> YT	57.5
UBC825	(AG) <sub>8</sub> T	52.5	UBC866	(CTC) <sub>6</sub>	62.0

的 PCR 反应体系中进行, 内含 1 @PCR Buffer, 1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 200 Lmol/L dNTP, 0.3 Lmol/L 引物, 40 ng 模板, 1.0 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为 94 e 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环: 94 e 变性 30 s, 复性 60 s, 72 e 延伸 90 s, 循环结束后 72 e 延伸 7 min, 4 e 保存。扩增产物在含 goldview (1%) 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离 1.5 h, 电压 5 V/cm。用 DL 2000 的 DNA marker(100~2 000 bp)作为标记, 电泳结束后在 BioRad Gel Doc2000 凝胶成像系统下观察并拍照记录。

1.5 统计分析 with 数据处理: 每个引物均经过重复扩增、电泳两次, 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) 均为一个分子标记, 代表一个引物的结合位点。根据分子标记的迁移率

旨在揭示金荞麦的遗传多样性及其遗传结构, 了解其种内变异, 为金荞麦这一重要药用资源的保护和育种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料: 实验所用材料采自重庆野生金荞麦的主要分布区南川石河子、黄草坪、北碚缙云山、黔江冯家镇、正阳镇和酉阳的后溪镇、钟多镇。各居群随机选取 10~12 个样本, 收集当年生嫩叶, 低温条件下带回实验室洗净、晾干, 冻于 -80 e 的超低温冰箱中备用。居群的产地、样本数、编号及居群生长状况见表 1。

1.3 ISSR 引物的筛选: ISSR2PCR 反应所用的引物由上海生工公司合成。共从 78 个随机引物中筛选出 12 个 (表 2) 扩增条带清晰、多态性明显、反应稳定的引物用于 8 个居群的 92 个个体的扩增, 每个选定的引物至少重复扩增 2 次。

1.4 PCR 扩增及产物检测: ISSR2PCR 反应在 25 LL

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。采用 POPGEN32 软件, 计算各居群的多态位点百分率 (PPL)、Neics 基因多样性指数 (H)、Shannoncs 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)、Neics 遗传一致度和遗传距离 (D), 并根据 Neics 遗传距离进行 UP2 GMA 聚类分析, 构建系统树状图。

2 结果与分析

2.1 金荞麦的遗传多样性: 通过 12 个引物对金荞麦 8 个居群的 92 个个体进行了 ISSR 分析, 共检测到位点 103 个, 相对分子质量均在 100~2 000 bp (图 1), 其中多态性位点 90 个, 占 87.38%。Neics 基因多样性指数 H = 0.374 7, Shannoncs 多态性信

息指数  $I = 0.5728$ 。金荞麦不同群体的多态位点百分率在 59.22%~73.79%，其中最高的是酉阳后溪镇居群，为 73.79%；最低的是黔江正阳镇居群，为 59.22%。 $H$  范围为 0.3487~0.3974， $I$  范围为 0.6292~0.4932(表 3)。 $H$  和  $I$  的大小与各居群多态位点百分率的高低趋势基本一致，各项系数均是酉阳后溪镇居群最高，黔江正阳镇居群最低。

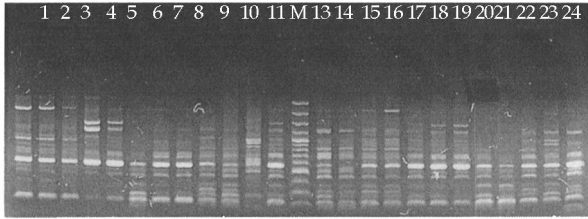


图 1 引物 UBC847 对部分个体的扩增结果

Fig. 1 ISSR Amplified products generated by UBC847 of different F1 cymosum samples

表 3 金荞麦的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of F1 cymosum

居群	个体数	多态位点数	多态位点百分率/%	H	I
QJFJ	12	64	62.14	0.3521	0.5494
QJFZ	12	63	61.17	0.3504	0.5233
QJZY	12	61	59.22	0.3487	0.4932
BBJY	12	70	67.96	0.3749	0.6046
NCSH	12	67	65.05	0.3693	0.5809
NCHC	10	66	64.08	0.3674	0.5773
YYHX	12	76	73.79	0.3974	0.6431
YYZD	10	72	69.90	0.3845	0.6292
总计	92	103	87.38	0.3747	0.5728

表 5 野生金荞麦 8 个居群遗传一致度(对角线以上)和遗传距离 D(对角线以下)

Table 5 Genetic similarity coefficient (above diagonal) and genetic distance D (below diagonal) of F1 cymosum

居群	QJFJ	QJFZ	QJZY	BBJY	NCSH	NCHC	YYHX	YYZD
QJFJ	***	0.9545	0.9372	0.7544	0.6931	0.7137	0.8528	0.8437
QJFZ	0.0431	***	0.9383	0.7563	0.6994	0.7248	0.8634	0.8537
QJZY	0.0937	0.0855	***	0.7328	0.6843	0.6936	0.8623	0.8728
BBJY	0.2744	0.2831	0.3008	***	0.7436	0.7554	0.7633	0.7784
NCSH	0.3643	0.3527	0.3849	0.2683	***	0.9041	0.7844	0.7939
NCHC	0.3214	0.3155	0.3588	0.2981	0.1144	***	0.8031	0.8244
YYHX	0.2386	0.2147	0.2019	0.2537	0.2632	0.1632	***	0.9403
YYZD	0.2392	0.8357	0.1859	0.2483	0.2728	0.2533	0.0648	***

酉阳的后溪镇(YYHX)和钟多镇(YYZD)两个居群也聚在一起,然后又与北碚缙云山(BBJY)居群进行聚类,最后进行聚类的是南川的石河子(NCSH)和黄草坪(NCHC)两个居群。总的来看,地理分布相近的居群都聚在了一起,聚类结果显示与地理分布明显的一致性。

### 3 讨论

金荞麦物种水平的多态位点百分率 PPB 为 87.38%, 高于其他草本克隆植物, 如延龄草<sup>[20]</sup> (PPB=34.07%,  $H=0.0337$ ), 这表明金荞麦具有

2.2 金荞麦不同居群的遗传分化分析: 金荞麦各居群的  $H_t$  为 0.3749,  $H_s$  为 0.3105, 根据  $H_t$  和  $H_s$  来计算  $G_{st}$  为 0.1718(表 4)。这表明有 17.18% 的变异是存在于居群间的, 而 82.82% 的变异是存在于居群内的。居群的遗传分化表明, 金荞麦居群间的分化程度较小, 但是金荞麦居群内部却具有高度的遗传分化。

表 4 金荞麦 8 个居群总的遗传分化

Table 4 Genetic variation among eight populations of F1 cymosum

引物	$H_t$	$H_s$	$G_{st}$
平均	0.3749	0.3105	0.1718
标准差	0.0149	0.0121	

2.3 金荞麦居群间的遗传距离和聚类分析: 金荞麦 7 个居群的  $Ne_{cs}$  遗传一致度为 0.6843~0.9545,  $D$  为 0.0431~0.3849(表 5)。其中黔江正阳居群(QJZY)与南川黄草坪居群(NCSH)之间的遗传距离最大, 为 0.3849, 这也表明两者之间的遗传差异性最大, 相似度也是最低的, 为 0.6843。黔江冯家镇的两个居群(QJFJ 和 QJFZ)之间的遗传距离最近, 为 0.0431, 同样相似度是最高的, 为 0.9545。

金荞麦 UPGMA 聚类图(图 2)显示: 8 个野生居群中黔江冯家镇的两个居群(QJFJ 和 QJFZ)首先聚在一起, 这也正说明了两个居群之间的遗传距离最近, 然后又与黔江的正阳镇居群(QJZY)聚在一起, 上述 3 个居群间的聚类反映了地理分布上的一致性。

较高的遗传多样性, 而且遗传多样性不仅存在于居群间, 也存在于居群内。根据  $Ne_{cs}$  遗传分化指数估算的 8 个居群间的遗传分化系数为 0.1718, 说明居群间的分子变异只占总的基因多样性的 17.18%, 居群内占 82.82%。这表明居群内的遗传多样性较高, 居群间的遗传多样性相对较低。遗传分化的分析结果显示: 大量的变异主要存在于金荞麦居群内, 只有少量的变异存在于居群之间。金荞麦居群严格地按照空间距离之间的联系聚在了一起, 这可能与共生境有关。地理距离近的居群生境相似, 地理距

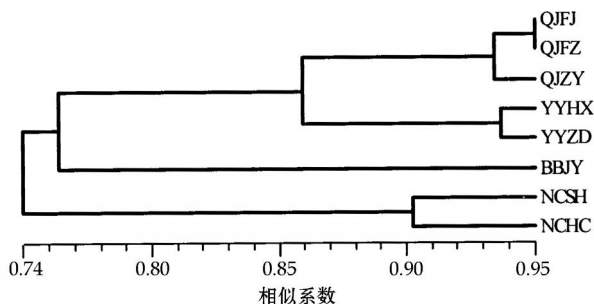


图 2 金荞麦 8 个居群的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA Dendrogram of eight populations of *Fl. cymosums*

离远的居群生境差异相对较大。在环境选择压力的作用下,不同居群之间的分子变异可能与地理位置联系比较大。张春平等<sup>[21]</sup>对渝东地区野生金荞麦的数量分类及排序研究也证实了这个问题。

通过研究表明金荞麦具有相对较高的遗传多样性,因此造成金荞麦资源减少的主要原因可能不是其遗传方面的因素,更主要的原因可能是大量而无节制地采挖和野生金荞麦生境的人为破坏。为切实保护好金荞麦药用资源,实现资源的可持续利用,建议在人为活动较强的地区,加大宣传力度,有效控制金荞麦的采挖;实行就地或迁地活体保存;利用现有的或新建专用的药用植物种质资源库,进行种质的低温保存;保护好野生金荞麦的生长环境,金荞麦喜光照,因此建议在林外补充实生苗的数量,以扩大野生居群。在种质资源分布集中的地域,建立金荞麦自然保护区(农业部已经在黔江建立了我国目前第一个/野生金荞麦原生境保护区),禁止破坏性利用,防止各种人为干扰,充分发挥金荞麦群落的生态和经济效益。并且可以尝试人为创造居群间的基因交流和重组的条件,更好地维持其遗传多样性水平。

参考文献:

- [1] 彭勇,孙载明,肖培根!金荞麦的研究与开发[J]!中草药,1996,27(10):629
- [2] 中国药典[S]!一部!2000
- [3] 张益锋,何平,李桂强,等!不同施水处理对金荞麦形态和生物量分配的影响[J]!中草药,2009(9):145-145
- [4] 吴清,梁国鲁!金荞麦野生资源的开发与利用[J]!中国野生资源,2001,20(2):272-281
- [5] 高倬,孟凡虹!野荞麦根素对四种人癌细胞克隆形成能力的影响[J]!中国中药杂志,1993,18(8):498
- [6] 赵佐成,周明德,王中仁,等!中国苦荞麦及其近缘种的遗传多样性研究[J]!遗传学报,2002,29(8):723-734
- [7] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D! Genome fingerprinting by simple sequence repeats(SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]! Genomics,1994,20(2):176
- [8] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, et al! Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]! Theor Appl Genet,2001,102:726
- [9] 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):1627-1630
- [10] 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):1630-1634
- [11] 廖丽,郭巧生!夏枯草ISSR分子标记技术的建立与体系优化[J]!中草药,2009,40(7):1132-1135
- [12] 张春平,何平,王瑞波,等!三角叶黄连ISSR反应体系的建立与优化[J]!中草药,2009,40(2):282-284
- [13] 倪开诚,闵芳,郭卫东,等!采用ISSR分子标记进行珊瑚礁8个种源的遗传多样性分析[J]!中草药,2008,39(9):1392-1396
- [14] 罗明信,伍贤进,彭帅,等!12种翻白草种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]!中草药,2008,39(5):748-751
- [15] 金燕,张文驹,傅大煦,等!利用ISSR标记研究野大豆居群内遗传变异及其取样策略[J]!植物学报,2003,45(8):992-998
- [16] 李海生,陈桂珠!中国杯萼海桑遗传多样性的ISSR研究[J]!植物学报,2004,46(5):515
- [17] 邱英雄,傅承新,吴斐捷!明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的ISSR分析[J]!中国中药杂志,2003,28(7):598
- [18] 钱韦,葛颂,洪德元!采用RAPD和ISSR标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]!植物学报,2000,42(7):74
- [19] 邹喻萍,葛颂,王晓东!系统与进化植物学中的分子标记[M]!北京:科学出版社,2001
- [20] 李群,肖猛,郭亮,等!四川省珍稀濒危植物延龄草遗传多样性分析[J]!北京林业大学学报,2005,27(4):1261
- [21] 张春平,何平,冀花存,等!渝东地区药用保护植物金荞麦群落数量分类和排序研究[J]!西南大学学报,2007,29(8):107

欢迎订阅 2011 年中成药6杂志

5 中成药6 杂志是国家食品药品监督管理局信息中心中成药信息站出版的国家级期刊,月刊,国内外公开发行。

本杂志创刊于 1978 年 8 月。本刊历来被权威的北京大学图书馆确认为全国中文核心期刊,2008 年再次被确认,见 5 中文核心期刊要目总览 6 (北京大学出版社 2008 年版)。本刊多年来一直被确认为中国自然科学核心期刊,中国科学引文数据库核心期刊,5 中文科技资料目录)) 医药卫生 6 收录源期刊,5 中国生物学文摘数据库收录期刊,并获得首届中国学术期刊 5 CAJ) CD 规范 6 优秀期刊奖。据权威的 5 中国学术期刊综合引证报告 6,本刊 2008 年的载文量、影响因子、总被引频次、他引总引比等指标名列国内中医、中药类 44 种杂志的前茅。(见 5 中国学术期刊综合引证报告 6 科学技术出版社 2008 版)。

本刊主要报道中成药临床应用、药理作用、制剂工艺、质量标准、成分分析、饮片炮制、综述、古方研究、制药设备、企业管理、植物提取物等方面的研究论文。科研论文附英文摘要,并欢迎英文稿件。本刊为从事中成药及植物药科研、生产、教育、临床及经营、管理人员的必读刊物。

本刊为月刊,从 2009 年始,扩版为 168 页,每期(册)定价为人民币 25 元。国内邮发代号:42249;国外代号:M21093。欢迎到当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址:上海市汉口路 239 号 450 室

电话:(021)63213275,63213363

电子信箱:zcy.med@foxmail.com

邮编:200002

传真:(021)63213363

投稿网址: http://zcy.cb.cnki.net