



利用 ISSR-PCR 方法分析单叶蔓荆 居群的遗传多样性

刘荣华^{1*}, 詹雪晶¹, 黄璐琦², 陈美兰², 黄慧莲¹, 马志林¹, 邵峰¹

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:对山东和江西单叶蔓荆的 4 个居群 80 个样本进行资源考察和种内遗传变异情况分析。方法:利用 ISSR 分子标记技术。结果:从 100 条 ISSR 引物中筛选出 15 条特异性强、稳定性好的引物进行 ISSR 分析。共获得 129 个位点,其中多态位点数 115 个,多态位点百分率为 89.15%。利用 PopGene 软件进行分析,结果表明居群之间的平均多态位点百分率为 71.89%,Shannon 表型多样性指数(I')平均值为 0.220 4,具有较高的遗传多样性。结合聚类分析和地理变异规律把种群划分为 2 个大的种群组:山东居群组和江西居群组。结论:以上结果可为单叶蔓荆种质资源的保护和利用以及物种分化研究提供依据。

[关键词] 单叶蔓荆;ISSR-PCR;遗传多样性

单叶蔓荆 *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham 属于马鞭草科牡荆属植物,多年生落叶藤本。其成熟果实蔓荆子为常用中药材,已被 2005 年版《中国药典》收载,具有疏散风热,清利头目之功效。用于风热感冒头痛,齿龈肿痛,目赤多泪,目暗不明,头晕目眩等症。

单叶蔓荆喜湿润气候,耐寒、耐高温、耐贫瘠、耐涝,多生长于海滨、湖畔、沙滩等近水处及阳光充足地带。山东和江西为我国单叶蔓荆主产区,野生资源量较大。近年来,人工栽培的资源量亦占较大比重。单叶蔓荆茎蔓生地面,着地处生有大量不定根,根系发达,深度可达土层 3 m 左右,有固沙改土、蓄水棵墒的功能。种植蔓荆的沙滩地能有效控制风沙流动,防止风沙向林带侵蚀,保护基干林带,改善生长环境,促进林木生长。另外,其藤条还可用于编织,具有一定的经济价值^[1-2]。

ISSR(inter-simple sequence repeat)是一种新型的分子标记技术^[3],具有比 RAPD 更高的重复性和稳定性^[4]。近年来,ISSR 分子标记已被广泛应用于植物的遗传多样性研究^[5-7]。本实验运用 ISSR 方法

对单叶蔓荆主产区江西省和山东省 4 个居群 80 个样本的单叶蔓荆进行遗传多样性分析,为保护和合理开发单叶蔓荆药用植物资源提供依据。

1 材料

1.1 植物 在单叶蔓荆的 2 个主产区选择 4 个主要居群,山东省的烟台市和威海市、江西省的都昌县和星子县,于 6 月采取鲜嫩叶片,每个居群采集 20 个样本,共 80 个样本,放入变色硅胶中脱水干燥,置于低温干燥处保存。所有样本基原均经作者鉴定,凭证标本存于江西中医学院植物标本室。各居群所在的地理位置及其生长环境见表 1。

1.2 试剂 ISSR 引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物序列。*Taq* 酶及配套缓冲液购自大连宝生物工程有限公司,其余试剂皆为分析纯。

1.3 仪器 X-92 PCR 仪(杭州旭日公司),Z-323K 型高速冷冻离心机(德国 HERMLE 公司),JS-680B 凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法提取 DNA^[8],选取每个居群相同编号的样品一起研磨提取,作为筛选引物的模板。用紫外分光光度计测定 260,280 nm 下的吸光度 A ,然后根据文献方法确定总的 DNA 的浓度和质量^[9],将样品稀释至 $40 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,用于 PCR 反应。

[稿件编号] 20091224003

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2006CB504700)

[通信作者] *刘荣华,教授,硕士生导师,研究方向为中药质量评价及中药药效物质基础,Tel:(0791)7119010,Fax:(0791)7118658,E-mail:rhliu@163.com

表 1 4 个居群单叶蔓荆的生长环境及地理位置

居群	产地	地理位置	海拔/m	生境
烟台	烟台牟平姜格庄	东经 121°35' 北纬 37°23'	115	姜格庄镇海边沙滩
威海	威海市	东经 122°01' 北纬 37°05'	200 ~ 300	海滩沙地
都昌	都昌县老爷庙附近沙丘地	东经 116°03' 北纬 29°22'	14 ~ 18	鄱阳湖湖岸沙丘
星子	星子县蓼花镇	东经 116°00' 北纬 29°23'	40 ~ 60	江河沿岸沙丘地带

2.2 引物的筛选 由于碱基的种类、数目和排列顺序的差异,各引物对 PCR 反应条件的要求存在较大差异,各引物所要求的最佳退火温度也不同。从 100 条 ISSR 引物中筛选出 15 条特异性强、稳定性好的引物对江西和山东 4 个居群的全部 DNA 样品进行分析。引物的退火温度在 51 ~ 62 °C,见表 2。

表 2 用于单叶蔓荆 ISSR 分析的引物

引物	序列(5'-3')	T_m 值 /°C	实际退火温度 /°C
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	60.0
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	53.7
813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	50	51.2
820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	52	56.0
829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	52	56.0
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	56	52.7
842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	58	51.3
846	CACACACACACACACART	58	57.0
851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	58	57.0
857	ACACACACACACACACYG	58	56.5
859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	58	58.0
862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	60	65.0
867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	72	62.0
880	GGAGAGGAGAGAGAGA	48	51.3
881	GGGTGGGTGGGGTGTG	54	57.0

注:其中 R = AG, Y = CT。

2.3 PCR 扩增及检验 ISSR 扩增反应体系经过比较和优化,最终确立为 25 μ L 的 PCR 反应液。内含 40 ~ 50 ng 模板 DNA (2 μ L), 1.5 U *Taq* 酶 (3 μ L), 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 10 \times PCR Buffer (2.5 μ L), 1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ (1.5 μ L), 0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs (2 μ L), 40 ng ISSR 引物 (2 μ L)、灭菌双蒸水 (11.5 μ L)。反应程序为 94 °C 预变性 5 min,紧接着进行 35 个循环,94 °C 反应 1 min,48 ~ 60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1.5 min,最后 72 °C 延伸 10 min,于 4 °C 保存。

扩增产物在含有 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离,以 100 bp marker 为相对标准分子质量

(100 ~ 1 500 bp),约 100 V 电压下电泳 1 h 左右,凝胶成像分析系统拍照分析。

2.4 数据分析 ISSR 是显性标记,同一条引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物并按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳带谱,形成 ISSR 表型数据矩阵用于进一步分析。为反映 ISSR 标记的多态性,统计各引物的多态条带比率(PPB, percentage of polymorphic bands),并用 POPGENE 软件计算 ISSR 扩增产物的 Shannon 多样性指数(I , Shannon's information index),观测等位基因数(N_a , number of alleles per locus),Nei'S 基因多样性(H),遗传分化指数(G_{st} , coefficient of population differentiation, $G_{st} = D_{st} \cdot H_t^{-1} = (H_t - H_s) \cdot H_t^{-1}$)。并用 NISYS 中的 SHAN 程序进行 UPGMA 聚类分析样品间的遗传关系。

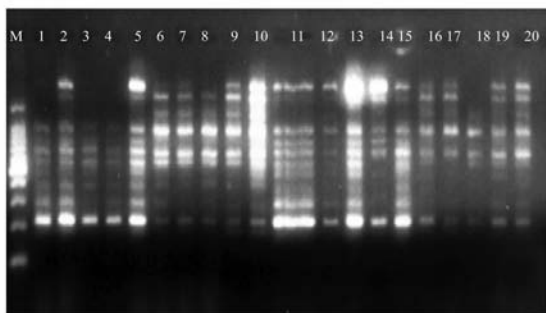
3 结果

3.1 单叶蔓荆的 ISSR 遗传多样性 用 15 条引物对 4 个居群的 80 个样品进行 ISSR 分析,共获得位点数 129 个,其中多态位点数 115 个,多态位点百分率为 89.15%。居群内多态性位点百分率(P)平均为 71.89%。蔓荆子物种水平的有效等位基因数 A_e 为 1.596 9,遗传多样性 GD 为 0.339 7,Shannon's I 为 22.04%,说明有 22.04% 的遗传变异发生在居群间。4 个居群的遗传变异从高到低依次为烟台 > 威海 > 都昌 > 星子。利用 POPGENE 软件计算的不同居群多态性位点百分率(P)、有效等位基因数(A_e)、Shannon 指数(I)、遗传多样性 GD 的值见表 3。居群之间的遗传变异水平相差不大(烟台 P 79.07%, A_e 39.95%; 威海 P 72.09%, A_e 39.95%; 都昌 P 73.64%, A_e 39.55%; 星子 P 62.79%, A_e 41.75%),见图 1。

3.2 单叶蔓荆居群遗传变异的分析 对 4 个不同居群的蔓荆进行遗传多样性研究,发现其总体的变异程度不大($GD = 0.339 7$)。居群间的遗传一致度 0.888 7 ~ 0.949 2,遗传距离 D 的变化范围

表 3 基于 ISSR 检测的单叶蔓荆遗传多样性水平

产地	多态位点百分率	有效等位基因数	Nei's 基因多样性	Shannon's 指数
烟台	79.07	1.574 5	0.323 2	0.262 2
威海	72.09	1.505 9	0.286 9	0.280 4
都昌	73.64	1.553 6	0.305 1	0.287 0
星子	62.79	1.458 3	0.252 9	0.307 3



1~5. 山东烟台样品;6~10. 山东威海样品;
11~15. 江西都昌样品;16~20. 江西星子县样品。
图 1 引物 880 号扩增不同产地 20 个样品 DNA 电泳图

0.052 2~0.118 0,见表 4。都昌和星子居群最为相似,威海和都昌居群间的遗传距离最大。根据 Nei's 总基因多样性($H_t = 0.339 7$)和亚居群基因多样性($H_s = 0.292 0$)基因估测的居群间的遗传分化系数(G_{st})为 0.140 3,说明遗传变异主要来自居群内。根据 Wright 提出基因流(N_m)与居群的固定指数 F_{st} 存在关系 $N_m = 1 \cdot (4F_{st} + 1)^{-1}$,当 $N_m > 1$ 时,说明居群间存在一定的基因流。在蔓荆的 4 个居群中, N_m 值为 3.063 8,表明蔓荆居群间存在基因流,种群间的遗传分化处于中等水平。

表 4 ISSR 分析单叶蔓荆居群间遗传一致度(I) (右上角)和遗传距离(D)(左下角)

项目	烟台	威海	都昌	星子
烟台	-	0.929 8	0.903 2	0.897 5
威海	0.073 8	-	0.888 7	0.896 4
都昌	0.101 8	0.118 0	-	0.949 2
星子	0.108 2	0.109 4	0.052 2	-

3.3 聚类分析 为了进一步表明居群间的遗传关系,基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 法构建各居群遗传关系聚类图,见图 2。发现 4 个居群聚为 2 组。单叶蔓荆的 2 个分布地 2 个居群间的遗传距离较小,见表 4,威海和烟台 2 个居群的遗传距离为

0.073 8,都昌和星子 2 个居群的遗传距离为 0.052 2,而 2 个分布地间的遗传距离较大,为 0.101 8~0.118 0。从聚类图上可以看出,单叶蔓荆按 4 个自然居群按地理分布分为 2 支,烟台和威海 2 个居群聚在一起,而都昌和星子 2 个居群聚在一起,说明居群间的遗传分化程度与居群间的地理距离有关,两间断的地理分布产生了较大的遗传分化。

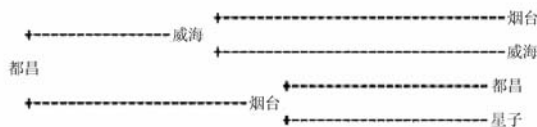


图 2 基于 Nei's 遗传距离的单叶蔓荆居群的 UPGMA 聚类图

4 讨论

本实验采用 ISSR 分子标记技术对江西和山东两省 4 个居群,共 80 个样本的单叶蔓荆遗传多样性进行了分析。有效等位数 $A_e = 1.596 9$,表明单叶蔓荆具有较高的遗传多样性,而 Shannon's 指数为 0.220 4,表明 4 个居群存在较大程度的遗传分化,居群间 $G_{st} = 0.140 3$,证实了遗传变异主要来自每个居群内部自身变异。

单叶蔓荆的栽培类型较少,但栽培环境差异较大,如江西省为中国内陆省份,土壤多为酸性红壤土,但山东省为中国沿海省份,威海和烟台两地濒海,土壤结构为碱性沙壤土。因此,可以证实居群间的遗传分化程度与居群间的地理距离和栽培环境具有密切关系,导致了其较大的遗传分化。

本试验的在聚类分析结果表明,山东省的 2 个居群间变异幅度较江西省大,说明单叶蔓荆在山东省的遗传多样性更为丰富,与彭艳丽等^[10]通过化学分析的结果一致。4 个居群的基因流 $N_m = 3.063 8$,表明种群间存在较为丰富的基因流动,可能是由于蔓荆种子以被鸟类吞服同时也易随洋流漂移作用所



导致。

山东和江西两省为单叶蔓荆主产区,其资源分布比例较大,但近年来由于不合理的恶性挖掘和生态环境遭到破坏,使单叶蔓荆资源急剧下降。本试验研究表明,由于单叶蔓荆居群间的遗传变异大于居群内的遗传变异,因此,居群数量的丰富与否对是否能够有效保护单叶蔓荆资源具有极为重要的意义。

[参考文献]

[1] 左长清,杨洁,李相玺. 江西省鄱阳湖湖滨沙地蔓荆的固沙效益[J]. 中国水土保持科学,2003,1(2):38.
[2] 杨洁,左长清. 蔓荆在鄱阳湖风沙区的适应性及防风作用研究[J]. 水土保持研究,2004,11(1):47.
[3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) 2 anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176.

[4] 邹喻苹,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.
[5] 葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的ISSR分析[J]. 生物多样性,2003,11(4):276.
[6] 马朝芝,傅廷栋, Tuevesson S,等. 用ISSR标记技术分析中国和瑞士甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学,2003,36(11):1403.
[7] 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):741.
[8] Doyle J J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M]//Hewitt C M, Johnston A. Molecular techniques in taxonomy[J]. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1991:283.
[9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current protocols in molecular biology[M]. New York: John Wiley & Sons,1995.
[10] 彭艳丽,刘红燕,张炳帧. 山东不同产地单叶蔓荆子挥发油GC-MS分析[J]. 山东中医药大学学报,2005,29(2):146.

Genetic diversity analysis of *Vitex trifolia* var. *simplicifolia* populations with inter-simple sequence repeats (ISSR) technique

LIU Ronghua^{1*}, ZHAN Xuejing¹, HUANG Luqi², CHEN Meilan², HUANG Huilian¹, MA Zhilin¹, SHAO Feng¹

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate 4 populations of 80 samples of *Vitex trifolia* var. *simplicifolia* collected from Shandong and Jiangxi province and analyze their intraspecies genetic variance. **Method:** Inter-simple sequence repeat (ISSR) technique was applied for the study. **Result:** Fifteen specific and stable primers were selected from 100 primers. A total of 129 sites were generated, and 115 of them (89.15%) were polymorphic. The data analyzed by PopGene demonstrated that the average polymorphic site percentage among the four populations was 71.89%. The average Shannon's information index was 0.2204. According to cluster analysis and the law of geographic variation, the populations were classified into two large groups: the Shandong group and the Jiangxi group. **Conclusion:** These results will provide the information for protection and utilization of *V. trifolia* var. *simplicifolia* and also further data for the study of genetic variation and species differentiation of *V. trifolia* var. *simplicifolia*.

[Key words] *Vitex trifolia* var. *simplicifolia*; ISSR-PCR; genetic variation

doi: 10.4268/cjcm20101304

[责任编辑 吕冬梅]