

金银花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析*

孙稚颖¹, 姚 辉^{2**}, 王振中³, 毕宇安³, 萧 伟^{3**}

(1. 山东中医药大学药学院 济南 250355; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院

药用植物研究所/濒危药材繁育国家工程实验室 北京 100193;

3. 江苏康缘药业股份有限公司/中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

摘 要:目的:探讨金银花种质资源的遗传多样性,为其育种提供参考。方法:对采自金银花主产区的 18 个农家品种及野生忍冬和近缘种灰毡毛忍冬共计 36 个样品进行 ISSR-PCR 分析,采用 NTSYS-pc 软件计算金银花不同农家品种及近缘种间的 Jaccard 遗传相似系数,按非加权配对算术平均法(UPGMA)建立所研究类群的系统聚类图。结果:12 条引物共扩增出 129 个条带,其中多态带为 114 条,占总扩增条带数的 88.37%,金银花种质资源具有较丰富的遗传多样性。从聚类分析图可以看出,金银花不同样本首先聚在一起,表明是一自然类群;野生忍冬与栽培品种具有明显的遗传差异;主产区传统品系毛花系列遗传相对较稳定,而鸡爪花系列品种繁杂,遗传变异大;新品种九丰一号已独立成一稳定品种。结论:ISSR 标记可以为金银花的种质资源鉴定、遗传关系分析及栽培育种提供分子生物学依据。

关键词:金银花 ISSR 种质资源 遗传多样性

doi: 10.11842/wst.2013.09.005 中图分类号: S567 文献标识码: A

金银花是传统大宗常用中药材,具有清热解毒、凉散风热的功效,有“中药之中的青霉素”之称,被列为出口创汇的主要品种。2010 年版《中国药典》中金银花原植物为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.^[1]。忍冬适生性较强,在我国自然分布广泛,但药材金银花多来自人工栽培,生产区域主要分布在山东与河南两省。山东产金银花俗称“东银花”,河南产金银花俗称“密银花”,品质均优良,驰名中外,以山东产量最大^[2]。据调查,山东年产金银花约 800 万公斤,种植面积达 20 万亩,约占全国总产量的 60%~70%^[3]。山东作为金银花的主产地,其种植区域又主要集中在临沂地区的平邑县、费县、蒙阴县等地,

其中平邑是国家命名的“中国金银花之乡”。此外,江苏康缘药业从平邑引种,在与平邑接壤的连云港东海县也建立了万亩金银花规范化种植基地,旨在为其中药注射剂大品种——热毒宁注射液提供优质原料药材。由于该药材在主产区栽培已久,经过长期的自然选择与人工选择,金银花的种质发生了明显的变异与分化,形成了很多农家品种,植株形态、药材产量与质量均呈现出明显差异。为了更好地开展选育抗逆(抗旱、抗病、抗虫)、高产、有效成分含量高的新品种及实现金银花生产的规范化,亟需进行金银花种质的鉴定与评价,以及分析不同种质间的遗传背景及亲缘关系^[4]。

简单重复序列间扩增(Intersimple Sequence Repeat, ISSR)是加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等^[5]于

收稿日期:2013-03-05

修回日期:2013-12-18

* 国家自然科学基金委重大项目(81130069):道地药材形成的生物学实质,负责人:陈士林;教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT1150):中药资源学,负责人:陈士林;工信部中药材生产扶持项目:万亩金银花规范化、规模化种植基地建设,负责人:萧伟。

** 通讯作者:姚辉,博士,副研究员,主要研究方向:中药资源与鉴定,萧伟,本刊编委,博士,研究员级高级工程师,主要研究方向:中药新药的研究与开发。

1994年提出的一种分子标记。它结合了随机引物扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)和简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)标记技术的优点,与以往的分子标记相比,能够提供更多的基因组DNA信息。现已广泛应用于药用植物种质资源鉴定、进化与亲缘关系分析、遗传多样性与居群遗传结构检测、遗传作图、基因定位、分子标记辅助育种等方面研究^[6, 9-12]。目前仅见王晓明等^[7]和李小侠等^[8]利用ISSR分子标记研究金银花的遗传多样性的报道。本研究在采集大量金银花主产区农家品种的基础上,选用ISSR标记技术探讨金银花不同农家品种在DNA水平上的差异,分析其种质资源遗传多样性,从而为其种质鉴定、亲缘关系分析、育种及合理开发利用提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 材料

在金银花地道产区山东省平邑县、费县等地收集了18个农家品种及野生忍冬和近缘种灰毡毛忍冬*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.共36个样品,样品经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员和山东中医药大学药学院周凤琴教授鉴定。取不同样品新鲜叶片,硅胶干燥保存备用。供试样品来源见表1。

1.2 仪器和试剂

DNA提取研磨仪(Retsch MM400, Germany),小型台式离心机(Sigma-1-14型, Germany),数显恒温水浴锅(HH-2型, 国华电器有限公司),PCR仪(PTC200, BIO-RAD公司),电泳仪(DYY III型电泳仪, 北京六一仪器厂),凝胶紫外成像系统(BIO-RAD),SANYO制冰机(ICE MAKER SIM-F140型)。

植物DNA提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., China),dNTP、TaqDNA聚合酶(北京赛百盛),引物(参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司2006年公布的ISSR引物序列,由上海Sangon合成),DL2000 Marker(大连赛恩斯公司),琼脂糖、EB(上海Sangon公司),其余试剂均为分析纯。

1.3 DNA的提取

取样约10 mg,用DNA提取研磨仪研磨1 min(30次/s)后,利用植物DNA提取试剂盒提取总DNA。

1.4 PCR扩增及产物检测

反应体系为25 μL:模板DNA 1.0 μL(~30 ng),1.0 μL primer(10 μmol·L⁻¹),2.5 μL PCR Buffer(10×)(Mg²⁺ free),Mg²⁺ 2 μL(25 mmol·L⁻¹),dNTPs混合物2 μL(2.5 mmol·L⁻¹),Taq DNA聚合酶1.0 U,加灭菌双蒸水至25 μL。反应程序:94℃ 5 min,94℃ 0.5 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,35个循环后于72℃延伸10 min,扩增完成后置于4℃保存。扩增产物于1.5%琼脂糖(内含1 μg·mL⁻¹ EB)凝胶电泳检测(5 V·cm⁻¹ 1~2 h),用DL2000 Marker作分子量标记,观察记录结果,分析扩增谱带。

1.5 数据分析及品种的鉴定

每一条引物均重复扩增、电泳3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及其有无统计所有的二元数据;“有”赋值为1(包括强带和重复性好的弱带);“无”赋值为0,从而得到原始数据矩阵,计算多态性条带比率,采用NTSYS-pc软件(Version 2.00)计算各品种间的Jaccard遗传相似系数,按非加权配对算术平均法(Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean,UPGMA)建立各品种间的聚类图。

2 结果

2.1 ISSR扩增多态性分析

从50个加拿大哥伦比亚大学设计的引物9#系列筛选出12个能扩增出清晰且具多态性条带的引物,用以对36份样品进行扩增,结果扩增出129个条带,其中多态带为114条,占总扩增条带数的88.37%,如除去与近缘种灰毡毛忍冬比较,则多态性比值下降为79.1%,见表2。扩增条带长度范围多集中在250~1 000 bp。由于ISSR揭示的是基因组DNA在酶切位点和其后的选择性碱基的变异,不同引物得到了各自不同的ISSR产物图谱;同一引物,不同供试材料间扩增带也不相同,充分表现了供试样品之间在DNA水平上存在一定的差异,具有丰富的遗传多态性(图1)。

2.2 聚类分析

36份样本被分成了7支,第1支为大毛花和小毛花;第2支包括大鸡爪、青鸡爪、麻针、大麻叶、红梗子、米花子和四季花;第3支包括小鸡爪、红鸡爪、红裤腿、线花、大麻叶、巨花2号、米花子和牻牛

表 1 实验材料及来源

编号	代码	品种	采集地	收集或采收时间
1	DM32	大毛花	山东省平邑县康成北岭	2008.5
2	DM3013	大毛花	山东省平邑县流峪镇岳家庄	2010.10
3	DM4018	大毛花	山东省平邑县郑城镇康城北岭	2010.10
4	XM1	小毛花	山东省平邑县郑城松林	2008.5
5	JZ3017	鸡爪花	山东省平邑县流峪镇黄林	2010.10
6	JZ4006	鸡爪花	山东省平邑县郑城镇燕家岭村	2010.10
7	JZ4015	鸡爪花	山东省平邑县郑城镇康城东岭	2010.10
8	DJ8	大鸡爪	山东省平邑县郑城柿子峪	2008.5
9	XJ15	小鸡爪	山东省平邑县郑城镇康城	2008.5
10	XJ3	小鸡爪	山东省平邑县郑城巩家山	2008.5
11	HJ34	红鸡爪	山东省平邑县燕家岭水库南	2008.5
12	HJ18	红鸡爪	山东省平邑县康成东岭	2008.5
13	QJ	青鸡爪	山东省平邑县郑城镇康城东岭	2008.5
14	SJ3013	四季花	山东省平邑县流峪镇孟家庄	2010.10
15	SJ3024	四季花	山东省平邑县郑城镇埠西村	2010.10
16	SJ4029	四季花	山东省平邑县武台镇西武沟村	2010.10
17	JF3031	九丰一号	山东省平邑县郑城镇埠西村	2010.10
18	JF4023	九丰一号	山东省平邑县地方镇九间棚农业科技园	2010.10
19	MZ33	麻针	山东省平邑县燕家岭水库南	2008.5
20	MZ7	麻针	山东省平邑县郑城康成	2008.5
21	DMY6	大麻叶	山东省平邑县郑城康成南岭	2008.5
22	DMY10	大麻叶	山东省平邑县康成陈山头	2008.5
23	DMY4014	大麻叶	山东省平邑县郑城镇康城东岭	2008.5
24	HGZ	红梗子	山东省平邑县康成东沟	2008.5
25	HGZ(m)	红梗子(混样)	山东省平邑县燕家岭南	2008.5
26	JH1	巨花 1 号	山东省费县上冶	2008.5
27	JH2	巨花 2 号	山东省费县上冶	2008.5
28	XH	线花	山东省平邑县郑城康成	2008.5
29	ZJ1	中金 1 号	山东省费县新庄	2008.5
30	MNT	牻牛儿腿	山东省平邑县郑城康成南岭	2008.5
31	MHZ	米花子	山东省平邑县康成东山根	2008.5
32	HKT5	红裤腿	山东省平邑县郑城康成	2008.5
33	HBh	河北花	山东省平邑县郑城埠西	2008.5
34	FQ	金银花	河南省新乡市封丘	2009.6
35	YRD	忍冬(野生)	山东省临沂市蒙山	2010.9
36	HZM	灰毡毛忍冬	山东省平邑县武台镇西武沟村	2010.10

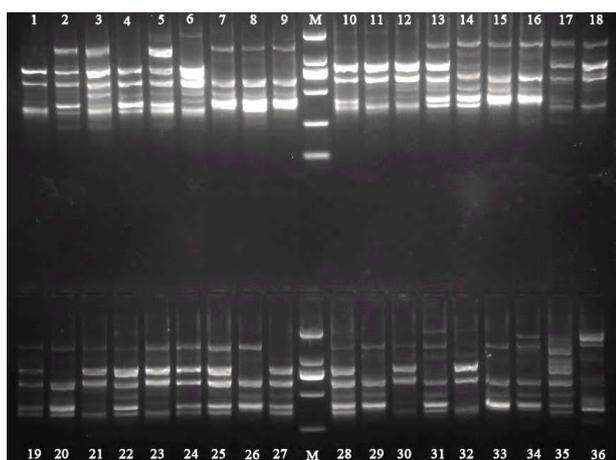


图1 引物 UBC857 扩增的 ISSR 带谱

儿腿;第4支包括小鸡爪、巨花1号、四季花、中金1号、河北花和采自封丘的栽培忍冬;第5支为九丰一号;第6支为野生忍冬;第7支为灰毡毛忍冬。见图2。

3 讨论

从图2可以明显看出,金银花原植物忍冬是一个非常自然的物种,作为山银花主要来源的灰毡毛忍冬很早即被区分开来。其次,野生忍冬与农家栽培品种差异也很明显,目前,我国金银花药材均来自人工栽培,产区长期的人工选择,使得其在遗传上发生了一定的变异。前人研究报道,金银花的传统栽培品系主要包括毛花系和鸡爪花系^[2,3]。从本研究结果看,毛花系,如大毛花和小毛花聚为一独立支,但由毛花系培育出的九丰一号已独立分化出来,形成遗传较稳定的一个品种。鸡爪花系所含农家品种繁杂,包括大鸡爪、小鸡爪、红裤腿、麻针、大麻叶等,品种间有交叉,新培育出的品种四季花嵌于其中。在取样过程中笔者发现,目前在金银花主产区一些品种虽然种植面积很大,但其真实性与优良性尚有待确证。此外,产地药农对良种的筛选是在盛花期,利用割条扦插、分株移栽进行

表2 ISSR 分析所用引物及其扩增结果

序号	引物(Primer)	序列(5'→3')	位点数目	多态位点	多态性/%
1	UBC815	(CT)8G	8	7 (6)	87.5
2	UBC818	(CA)8G	11	9 (8)	81.8
3	UBC811	(GA)8C	10	8 (7)	80
4	UBC822	(TC)8A	10	9 (7)	90.0
5	UBC807	(AG)8T	11	8 (8)	72.7
6	UBC834	(AG)8YT	12	10 (8)	83.3
7	UBC835	(AG)8YC	10	9 (14)	93.3
8	UBC825	(AC)8T	5	5 (4)	100
9	UBC855	(AC)8YT	10	9 (7)	90.0
10	UBC827	(AC)8G	12	11 (11)	91.7
11	UBC857	(AC)8YG	13	13 (12)	100
12	UBC873	(GACA)4	12	10 (10)	83.3

注:多态性位点 括号内为除去近缘种灰毡毛忍冬后金银花种内多态性位点。

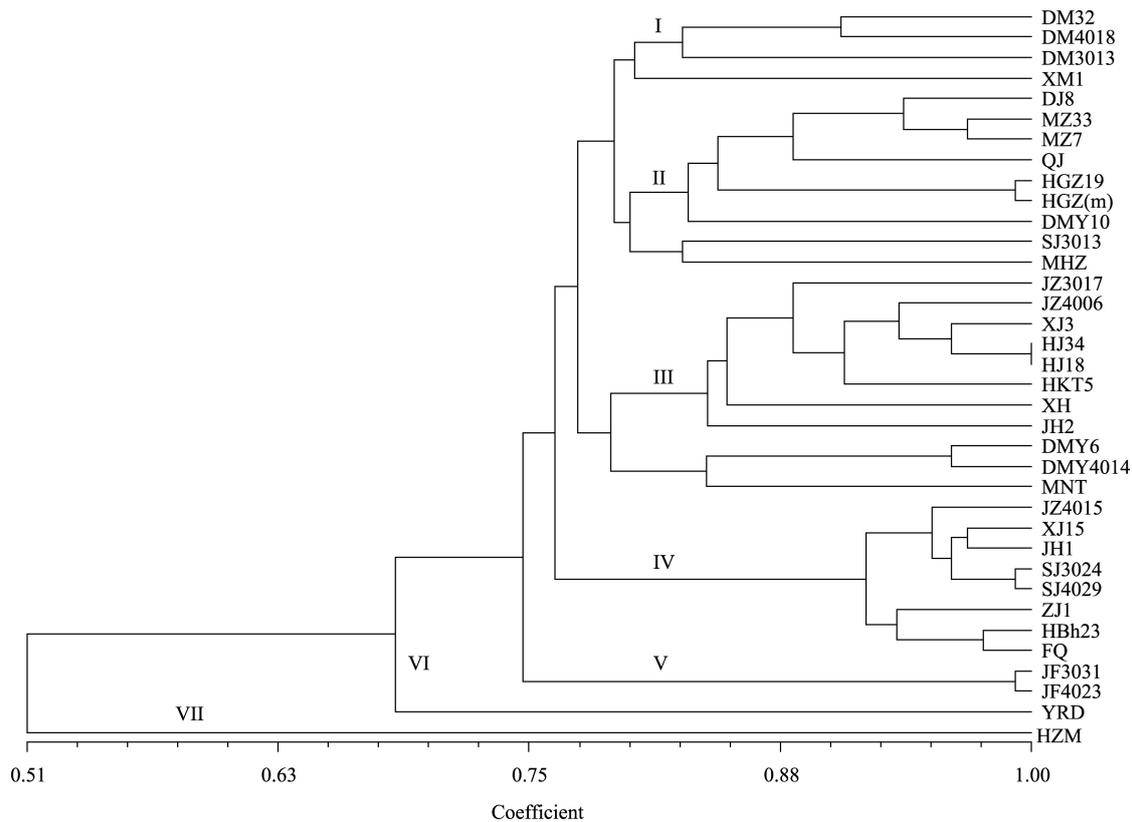


图2 金银花不同农家品种基于 ISSR 分析数据的聚类图

良种繁育,往往会将其他品种的枝条混入,因此产区花墩中以一个品种为主,混杂其他品种的现象比较普遍。

遗传多样性是生物所携带遗传信息的总和,是物种长期进化的结果,也是其生存和发展的前提。通过分析金银花不同农家品种和其近缘植物灰毡毛忍冬的 ISSR 扩增多态性,发现金银花种质资源具有较丰富的遗传多样性,为其良种选育及资源开发提供了重要的物质基础。山东平邑县是金银花的传统道地产区,具有悠久的栽培历史和丰富的种植经验,农家选育品种较多,明确不同农家品种间的遗传背景,对金银花的引种、品种改良和生产实践等均具有重要意义。ISSR 作为一种分子标记,能较好地反映金银花农家品种的遗传多样性,为金银花种质资源的品种选育与合理开发利用提供了理论指导。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:化学工业出版社, 2010:205.
- 2 张永清. 山东金银花生产情况调查. 山东中医杂志, 2000, 19(10): 621~624.
- 3 周凤琴, 张永清, 张芳, 等. 山东金银花种质资源的调查研究. 山东中医杂志, 2006, 25(4):268~271.
- 4 陈士林, 肖培根. 中药资源可持续利用导论. 北京:中国医药出版社, 2006.
- 5 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20(2):176~183.
- 6 王明明, 宋振巧, 王建华. ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用. *中草药*, 2007, 38(1):134~137.
- 7 王晓明, 谢碧霞, 李俊彬, 等. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析. *中南林业科技大学学报*, 2008, 28(6):14~18.
- 8 李小侠, 陶正明, 吴志刚, 等. 采用 ISSR 和 SRAP 技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性. *中草药*, 2012, 43(10):2030~2035.
- 9 王艳, 李先恩, 李学东, 等. 野生地黄种内遗传多样性的 RAPD, ISSR 分析. *中国中药杂志*, 2008, 33(22):2591~2595.
- 10 许永华, 张爱华, 金慧, 等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析. *中草药*, 2010, 41(7):1164~1167.
- 11 高燕会, 李慧慧, 朱玉球, 等. 基于 ISSR 的栝楼遗传多样性分析. *中草药*, 2011, 42(2):363~366.
- 12 张忠廉, 唐德英, 张丽霞, 等. 珠子草遗传多样性的 ISSR 分析. *中草药*, 2011, 42(10):2125~2129.

ISSR Analysis on Genetic Diversity of Germplasm Resource of *Lonicerae Japonicae* Flos

Sun Zhiying¹, Yao Hui², Wang Zhenzhong³, Bi Yu'an³, Xiao Wei³

(1. College of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd. / State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This paper was aimed to study the genetic diversity and genetic relationship of germplasm resource of *Lonicerae Japonicae* Flos in order to provide references for its breeding. A total of 36 samples from 18 farm varieties and wild species, as well as related species of *Lonicera japonica* Thunb. from the main production areas were studied by ISSR-PCR markers. The Jaccard coefficient was worked out by NTSYS-pc software. And a cluster dendrogram of different samples was established based on unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). The results showed that 12 ISSR primers generated 129 loci of which 114 loci were polymorphic. The average percentage of polymorphic bands (PPB) is 88.37%. In the cluster dendrogram, different samples of *Lonicera japonica* are in the same group, which showed that it is a natural species; the wild sample is separated from the cultivated samples; the traditional type-*Maohua* is relative stable, but the type of *Jizhuahua* includes complicated varieties, and it has obvious genetic variation; the new variety *Jiufeng* 1 has already distinct into one stable type. It was concluded that the ISSR method was suitable for germplasm identification, genetic diversity analysis of *Lonicerae Japonicae* Flos, thus providing a theoretical foundation for its cultivation and breeding.

Keywords: *Lonicerae Japonicae* Flos, ISSR, germplasm, genetic diversity

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)