

# 17 份鱼腥草种质亲缘关系的ISSR 分析

彭帅, 伍贤进\*, 罗芸, 唐冬英, 刘选明\*

(1. 湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 湖南长沙410082; 2. 怀化学院生物工程系, 湖南怀化418008)

**摘要** 利用ISSR 分子标记技术对17 份鱼腥草种质进行了基因组DNA 多态性分析。从50 条引物中筛选出12 条多态性引物用于PCR 扩增, 共扩增出112 条DNA 条带, 其中多态性条带95 条, 所占比例为84.8%, 平均每条引物扩增的DNA 条带数目为9.3 条。根据ISSR 扩增结果, 利用POPGENE 1.32 软件计算了Nei's 基因距离, Nei's 基因多样性指数(H) 为0.318 5, Shannon 信息指数(I) 为0.469 9, 并用MEGA 3.1 软件通过UPGMA 法进行了聚类分析。结果表明: 鱼腥草种质资源具有较丰富的遗传多样性, ISSR 技术可将17 份供试的鱼腥草材料全部分开, 在遗传距离系数0.2 处可将17 份材料划分成三大类, 其中多数材料根据ISSR 遗传距离系数划分的类群与地理位置分布有一定关系。同时对鱼腥草道地性与环境因素和遗传因素的关系进行了探讨。

**关键词** 鱼腥草; ISSR; 聚类分析; 遗传关系; 道地性

中图分类号 Q949.732.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03484-03

## Analysis of Genetic Relationship of 17 *Houttuynia cordata* Germplasm Resources With ISSR Marker

PENG Shuai et al (Institute of Life Science and Biotechnology, Bioenergy and Biomaterial Research Center, Hunan University, Changsha, Hunan 410082)

**Abstract** 17 germplasm resources of *Houttuynia cordata* were used as materials to analyze their genome polymorphism with ISSR markers. 12 primers screened out from 50 primers were used for ISSR amplification. A total of 112 bands were generated, of which 95 bands were polymorphic band (the percentage of polymorphic band, PPB = 84.8%). The average number of DNA fragments produced by each primer was 9.3. Nei's similarity coefficients and genetic distances were calculated with POPGENE software and the dendrogram were constructed with UPGMA. 17 *Houttuynia cordata* materials were divided into three major groups while the genetic distance was 0.20. The results indicated that there actually existed much genetic diversity at molecular level among the germplasm resources of *Houttuynia cordata*, and the genuineness of *Houttuynia cordata* was related with the environments in some way. The relationship between genuineness, genetic and environmental factors of *Houttuynia cordata* were discussed.

**Key words** *Houttuynia cordata* Thunb.; ISSR; Cluster analysis; Genetic Relationship; Genuineness

鱼腥草 (*Houttuynia cordata* Thunb) 为三白草科蕺菜属多年生草本植物, 其种质资源在植株形态、挥发性油含量及提取物抗病性等方面均有较大差异, 且遗传背景、彼此间亲缘关系尚不清楚, 运用新的分子标记技术加强鱼腥草种质资源遗传多样性与道地性的研究是有必要的。

DNA 分子标记 (DNA molecular marker) 是指可遗传并可检测的DNA 序列, 以个体间遗传物质核苷酸序列变异为基础, 是DNA 水平遗传变异的直接反映<sup>[1]</sup>。简单序列重复区间扩增多态性 (ISSR) 标记是近几年在微卫星分子标记基础上发展起来的一种新的分子标记<sup>[2]</sup>。ISSR 利用人工合成的16~18 个核苷酸重复序列作为引物, 在引物的3 端或5 端加上2~4 个随机选择但通常是简单的核苷酸, 对简单重复序列之间的DNA 序列进行PCR 扩增。ISSR 的引物设计比SSR 简单, 不需知道DNA 序列即可用引物进行扩增, 又比RAPD、SSR、AFLP 提供更多的遗传信息<sup>[3-4]</sup>, 现已在遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育等方面应用广泛<sup>[5-6]</sup>。笔者应用ISSR 标记, 从分子水平上探讨17 份鱼腥草种质资源的遗传多样性与亲缘关系, 为有效利用DNA 标记评价鱼腥草种质资源亲缘关系, 合理保护利用资源和新品种选育提供理论依据, 也为鱼腥草药材指纹图谱的构建奠定基础。

### 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 鱼腥草。用17 份鱼腥草 (表1) 的嫩叶提取总DNA, 室内试验在湖南大学生命科学与技术研究院实验室进行。主要试剂。MBI Taq 酶购自晶美生物有限公司;

DNA Marker 购于北京天为时代科技有限公司; 其他生化试剂为国产分析纯。仪器设备。PCR 仪为德国Biontra 公司生产的T GRADIENT; 离心机为德国Eppendorf 公司产品; 纯水器为美国Millipore 公司产品; 765P 紫外可见分光光度计为上海光谱仪器有限公司产品; 水浴锅、电泳槽等为国产仪器。所用引物。参照加拿大哥伦比亚大学UBC 公司2006 年公布的ISSR 引物序列, 由上海博亚生物技术有限公司合成。

表1 鱼腥草种质资源来源与生境

序号	材料号	来源	生境
1	ZJCL1	张家界慈利溪口镇	田埂, 人工栽培
2	HJT	怀化贺家田乡	田埂, 野生
3	HHXY	怀化学院植物园	植物园, 人工移植
4	ZJCL2	张家界慈利县零阳乡双安村	沟边, 野生
5	HHJ	怀化洪江天柱峰	山坡, 野生
6	HHTD	怀化通道县江口乡	路边, 野生
7	ZZ	株洲市文化路3 村	路边, 野生
8	EM	峨眉蕺菜	苗圃, 人工栽培
9	GXLC	广西陆川	路边, 人工栽培
10	CZYX	郴州永兴县	田埂, 野生
11	KM	云南昆明植物研究所	植物园, 人工栽培
12	XT	湘潭县	沟边, 野生
13	SCDS	四川乐山	路边, 野生
14	HHZJ	怀化芷江满塘溪	塘边, 野生
15	CZZX	郴州资兴	路边, 野生
16	CQYA	四川雅安三九基地	苗圃, 人工栽培
17	CS	长沙登高路	路边, 人工移植

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 提取和浓度测定。** 采用改进的CTAB 法, 取幼嫩叶约2 g 在液氮冷冻下研磨成粉末, 转入10 ml 离心管中, 加入3 ml 预热至65 的2 × CTAB 提取缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB,

基金项目 湖南省自然科学基金资助项目(06JJ50059)。

作者简介 彭帅(1982-), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。\* 通讯作者, E-mail: swxnh@hun.cn or hhxianjin@163.com。

收稿日期 2007-01-22

2%PVP,0.2% - 巯基乙醇 V/V),500  $\mu$ l 溶液 PB(10%CTAB,10%PVP,4%NaCl),0.02 gVE,混匀后65  $^{\circ}$ C水浴1.5 h,其间颠倒翻转离心管若干次,取出冷却至室温。加入等体积氯仿/异戊醇(24/1,V/V),混匀,置于摇床上震荡1 h,取出离心管后6 000 r/min离心30 min,取上清,加入1 ml 溶液PB,等体积氯仿/异戊醇(24/1,V/V),混匀后6 000 r/min离心10 min。取上清,加入-20  $^{\circ}$ C预冷的等体积异丙醇,轻柔混匀后静置30 min,出现絮状沉淀。用玻璃钩钩出絮状沉淀,转移至干净的1.5 ml离心管中,加入70%乙醇洗涤2~3次。倒去乙醇,让DNA自然晾干,加入500  $\mu$ l TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA)溶解DNA,加入RNaseA 1 U,于37  $^{\circ}$ C恒温水浴1 h。加入1/10体积的3 mol/L NaAc,并加入2倍体积的无水乙醇,小心混匀后,置-20  $^{\circ}$ C 60 min,DNA再次呈絮状沉淀析出,用玻璃钩钩出后,置1.5 ml离心管中,70%乙醇洗涤2~3次。倒去乙醇,自然晾干,加入100~200  $\mu$ l TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA),4  $^{\circ}$ C保存。

**1.2.2 ISSR PCR 反应体系。**PCR反应总体积为25  $\mu$ l,包括优化后的ddH<sub>2</sub>O 13.2  $\mu$ l,10 $\times$ PCR缓冲液2.5  $\mu$ l,dNTPs 2.5  $\mu$ l(2 mmol/L),MgCl<sub>2</sub> 2.3  $\mu$ l(25 mmol/L),引物1  $\mu$ l(10 mmol/L),DNA模板1  $\mu$ l(50 ng/ $\mu$ l),TaqDNA聚合酶1  $\mu$ l(1 U/ $\mu$ l),所有操作均在冰上进行。PCR反应程序如下:94  $^{\circ}$ C预变性5 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,51  $^{\circ}$ C退火45 s,72  $^{\circ}$ C延伸1.5 min,共循环35次,然后72  $^{\circ}$ C后延伸10 min,4  $^{\circ}$ C保温。

**1.2.3 扩增产物的检测。**将PCR产物在含有溴化乙锭(Et-B)染料染色的1.5%琼脂糖凝胶中电泳,电泳结束后在凝胶成像系统中照相保存。

**1.3 数据分析** 同一引物,同一位点,根据扩增产物的有(1)无(0)得到二元资料,形成0,1矩阵。用POPGENE 1.32软件进行分析,计算Nei's遗传距离<sup>[8]</sup>,使用MEGA 3.1软件根据遗传距离通过UPMGA法进行聚类分析,构建聚类图。

## 2 结果与分析

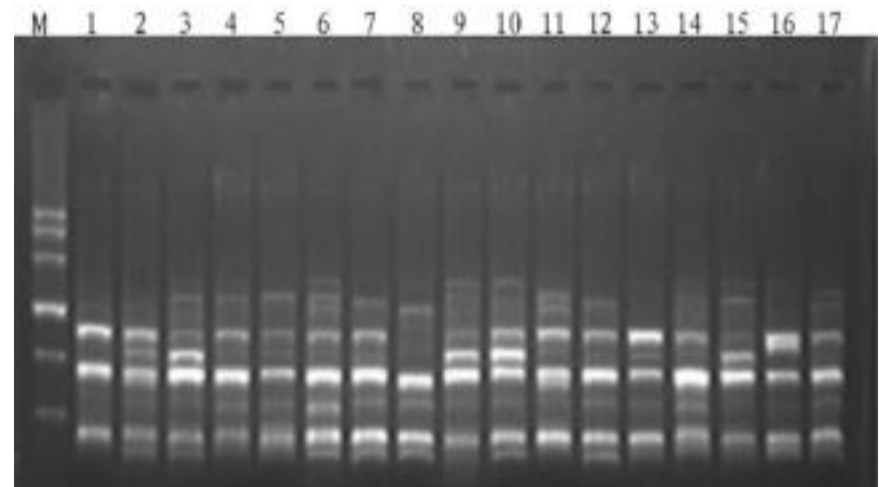
**2.1 引物筛选** 使用1号、3号、17号材料50条加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的ISSR引物序列进行筛选,从中筛选出12条扩增条带清晰,多态性好,重复性好的引物(表2)。

表2 用于ISSR分析的12条引物及其扩增产物

引物	序列	总条带数	多态性条带数	多态性条带比率/%
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	9	9	100.0
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA CC	9	7	77.8
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	13	10	76.9
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	9	9	100.0
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	8	7	87.5
UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	12	10	83.3
UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	9	7	77.8
UBC819	GIG TGT GIG TGT GIG TA	9	9	100.0
UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	8	6	75.0
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	7	6	85.7
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	9	7	77.8
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	10	8	80.0
小计		112	95	84.8

**2.2 ISSR-PCR 扩增结果** 用筛选出的12条引物对17份鱼腥草种质资源进行PCR扩增,共扩增出112条DNA条带,其中多态性DNA条带95条,占总条带数的84.8%,每个引物扩

增出的DNA条带数为7~13条,平均9.3条(表2),这些DNA片段大小主要集中在100~1 500 bp(图1、2),以200~1 200 bp的扩增片段居多。扩增条带数最多的引物为UBC810,达13条;扩增条带数最少的引物为UBC823,仅为7条。其中多态性百分比最高的引物为UBC807、UBC811、UBC819,达100%;最低的为UBC822,为75.0%。以上数据表明ISSR检测的鱼腥草种质在分子水平上的多态性是丰富的,也表明鱼腥草的遗传多样性极为丰富。



注: M为Marker MD107;分子量从下往上依次为300、500、1 000、1 500、2 000、2 500 bp;1~17泳道对应相同序号DNA模板。

图1 UBC808引物对鱼腥草基因组的ISSR扩增结果

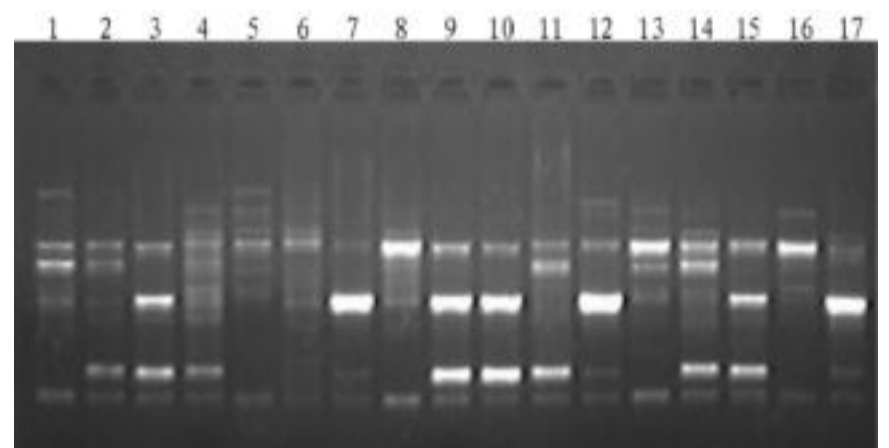


图2 UBC818引物对鱼腥草基因组的ISSR扩增结果

**2.3 聚类分析** 17份鱼腥草材料总的Nei's基因多样性指数(H)为0.318 5,Shannon信息指数(I)为0.469 9。17份材料的Nei's基因遗传距离0.113 3~0.624 2(表3)。从聚类图(图3)中可以看出,在遗传距离约0.2处,可将供试的17份鱼腥草材料分成3个大的类群。第一大类群包括1号、8号、13号、16号;第二大类群包括4号、5号、6号、11号、14号;第三大类群包括了3号、7号、9号、10号、12号、15号、17号。其中2号材料和第二、三大类群聚成一类。其中取自广西陆川的9号材料与取自郴州资兴的15号材料的遗传距离系数最近为0.113 3,遗传距离系数最远的是取自怀化洪江天柱峰的5号材料与取自峨眉蕺菜的8号材料,为0.624 2。

## 3 结论与讨论

ISSR分析具有技术操作简单、成本低、条件稳定、快速、灵敏、检测多态能力强、所需DNA模板量少等优点,目前已广泛应用于白梭梭<sup>[7]</sup>和葡萄<sup>[8]</sup>等品种的遗传多样性或品种鉴定的研究。吴卫等<sup>[9]</sup>对来源于四川省内的70份鱼腥草材料进行ISSR分析,通过聚类分析认为根据ISSR标记划分的类型同染色体数目有一定关系,染色体数目相同的材料有聚在一起的趋势。该研究中,通过使用12条ISSR引物对来自4个不同省份的17份鱼腥草材料进行了分析,共获得95条

多态性条带,得到的多态性条带比例为84.8%。通过ISSR-PCR得到的结果,经POPGENE 1.32软件分析,得到17份材料间的遗传距离与遗传相似性系数,并构建了17份鱼腥草材料的聚类图,可将这17份材料分为三大类。聚类分析表明,鱼腥草根据ISSR标记划分的类群与其地理位置分布有一定的关系,地理位置接近的多数材料都聚成一类。第一大类群中的8号、13号、16号都来自四川省,取自张家界慈利溪口镇的1号材料也划分在第一大类群中,而慈利的地理位置与四川省较为接近,不排除人为从四川引种的可能。第二大类群由4号、5号、6号、11号、14号材料组成,这些材料均分布于地理位置较为接近的怀化地区,而地理位置相对较远的

11号材料也包括其中,说明昆明植物研究所的材料与怀化地区的鱼腥草遗传距离较小,可能来源于该地区。取自长沙、株洲、湘潭的17号、7号、12号材料聚成一个亚类,与取自怀化学院、广西陆川、郴州永兴、郴州资兴的3号、9号、10号、15号组成的亚类形成了第三大类。遗传距离系数与聚类分析表明,ISSR分子标记技术可将鱼腥草供试的全部材料区分开来,同时也进一步阐明了鱼腥草种质资源即使在同一省和同一地区分子水平都存在丰富的遗传变异与遗传多样性,为ISSR技术用于构建鱼腥草DNA指纹图谱奠定了良好基础。

道地药材的优良品质是道地药材基因型与特定的环境

表3 17份鱼腥草材料的遗传距离(对角线下方)和遗传相似性(对角线上方)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		0.598 2	0.660 7	0.678 6	0.580 4	0.625 0	0.607 1	0.580 4	0.633 9	0.589 3	0.607 1	0.678 6	0.696 4	0.598 2	0.633 9	0.598 2	0.616 1
2	0.513 8		0.633 9	0.687 5	0.642 9	0.651 8	0.669 6	0.553 6	0.625 0	0.616 1	0.616 1	0.633 9	0.598 2	0.696 4	0.660 7	0.660 7	0.642 9
3	0.414 4	0.455 8		0.696 4	0.687 5	0.660 7	0.678 6	0.544 6	0.883 9	0.839 3	0.696 4	0.714 3	0.607 1	0.669 6	0.848 2	0.616 1	0.705 4
4	0.387 8	0.374 7	0.361 8		0.669 6	0.767 9	0.571 4	0.562 5	0.705 4	0.660 7	0.696 4	0.589 3	0.607 1	0.830 4	0.705 4	0.598 2	0.598 2
5	0.544 1	0.441 8	0.374 7	0.401 0		0.723 2	0.651 8	0.535 7	0.696 4	0.741 1	0.723 2	0.633 9	0.616 1	0.678 6	0.660 7	0.642 9	0.642 9
6	0.470 0	0.428 0	0.414 4	0.264 2	0.324 0		0.642 9	0.562 5	0.633 9	0.660 7	0.696 4	0.642 9	0.607 1	0.741 1	0.651 8	0.598 2	0.651 8
7	0.499 0	0.401 0	0.387 8	0.559 6	0.428 0	0.441 8		0.616 1	0.687 5	0.696 4	0.660 7	0.839 3	0.607 1	0.651 8	0.687 5	0.687 5	0.794 6
8	0.544 1	0.591 4	0.607 6	0.575 4	0.624 2	0.575 4	0.484 4		0.571 4	0.598 2	0.633 9	0.705 4	0.669 6	0.571 4	0.589 3	0.678 6	0.607 1
9	0.455 8	0.470 0	0.123 4	0.349 1	0.361 8	0.455 8	0.374 7	0.559 6		0.848 2	0.669 6	0.705 4	0.598 2	0.678 6	0.892 9	0.642 9	0.678 6
10	0.528 8	0.484 4	0.175 2	0.414 4	0.299 7	0.414 4	0.361 8	0.513 8	0.164 6		0.767 9	0.714 3	0.571 4	0.669 6	0.794 6	0.651 8	0.687 5
11	0.499 0	0.484 4	0.361 8	0.361 8	0.324 0	0.361 8	0.414 4	0.455 8	0.401 0	0.264 2		0.625 0	0.642 9	0.687 5	0.616 1	0.598 2	0.705 4
12	0.387 8	0.455 8	0.336 5	0.528 8	0.455 8	0.441 8	0.175 2	0.349 1	0.349 1	0.336 5	0.470 0		0.642 9	0.633 9	0.705 4	0.651 8	0.723 2
13	0.361 8	0.513 8	0.499 0	0.499 0	0.484 4	0.499 0	0.499 0	0.401 0	0.513 8	0.559 6	0.441 8	0.441 8		0.633 9	0.580 4	0.758 9	0.616 1
14	0.513 8	0.361 8	0.401 0	0.185 9	0.387 8	0.299 7	0.428 0	0.559 6	0.387 8	0.401 0	0.374 7	0.455 8	0.455 8		0.714 3	0.642 9	0.678 6
15	0.455 8	0.414 4	0.164 6	0.349 1	0.414 4	0.428 0	0.374 7	0.528 8	0.113 3	0.229 9	0.484 4	0.349 1	0.544 1	0.336 5		0.660 7	0.696 4
16	0.513 8	0.414 4	0.484 4	0.513 8	0.441 8	0.513 8	0.374 7	0.387 8	0.441 8	0.428 0	0.513 8	0.428 0	0.275 8	0.441 8	0.414 4		0.625 0
17	0.484 4	0.441 8	0.349 1	0.513 8	0.441 8	0.428 0	0.229 9	0.499 0	0.387 8	0.374 7	0.349 1	0.324 0	0.484 4	0.387 8	0.361 8	0.470 0	

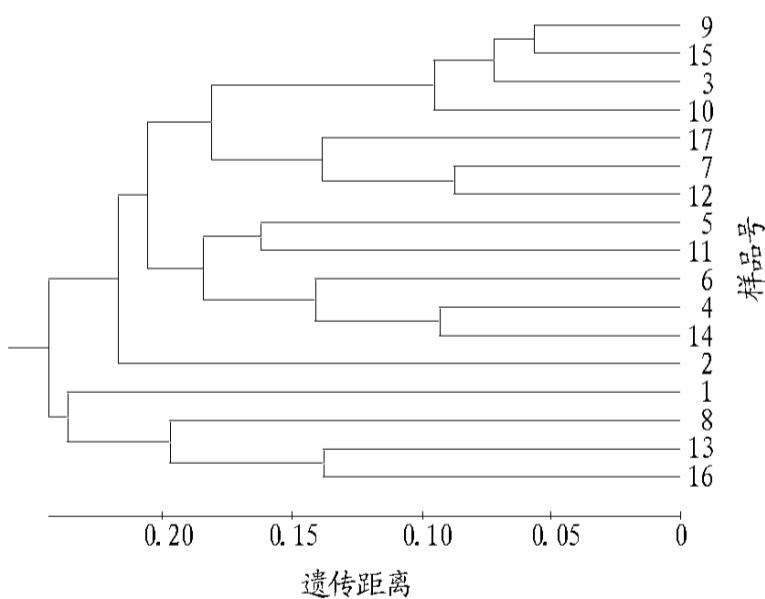


图3 17份鱼腥草材料基于ISSR遗传距离系数的聚类图

条件长期作用的结果,而特定的基因是药材道地性形成的关键<sup>[10]</sup>。据报道,野生与人工栽培的鱼腥草提取物无论是挥发性油含量或者成分都存在较大差异<sup>[11-12]</sup>。也有报道称,将相同来源的鱼腥草作不同加工处理后,其注射液指纹图谱间存在一定差异<sup>[13]</sup>。综上所述,DNA分子标记在研究中药药材道地性方面有着独特的优点,但因为道地性是一个多因素的复杂系统,相信将DNA分子标记与环境因素、人工栽培加工相结合,对中药药材道地性研究具有重要作用。

#### 参考文献

- [1] 刘明,王继华,王同昌.DNA分子标记技术[J].东北林业大学学报,2003,31(6):65-67.
- [2] ZELIKOWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [3] GILBERT J E, LEWIS R B, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1125-1131.
- [4] PREVOST A, WILKINSON M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 107-112.
- [5] 钱伟,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):741-750.
- [6] 邱英雄,傅承新,孔航辉.乐昌含笑不同类型鉴定的ISSR PCR分析[J].林业科学,2002,38(6):49-52.
- [7] 张萍,董玉芝,魏岩.利用ISSR标记对新疆白梭梭居群的遗传多样性分析[J].云南植物研究,2006,28(4):359-362.
- [8] 吴子龙,方连玉,王军,等.15份葡萄种质亲缘关系的ISSR分析[J].果树学报,2006,23(4):605-608.
- [9] 吴卫,郑有良,陈黎.利用ISSR标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J].世界科学技术——中医药现代化,2003,5(1):70-77.
- [10] 李萍,蔡朝晖,邢俊波.5SrRNA基因间区序列变异用于金银花药材道地性研究初探[J].中草药,2001,32(9):834-837.
- [11] 郝小燕,李零,丁智慧,等.黔产野生鱼腥草挥发油成分分析[J].云南植物研究,1995,17(3):350-352.
- [12] 刘香,李德,廖桂兰,等.人工栽培和黔产野生鱼腥草中挥发油成分的研究[J].贵阳医学院学报,1997,22(4):361-362.
- [13] 卢红梅,梁逸曾,伍贤进,等.分别用鲜草与干草生产的鱼腥草注射液指纹图谱对比研究[J].分析化学,2006,34(6):813-816.