

不同产地猫豆遗传多样性的 ISSR 分析

邱亚玲, 秦民坚*, 戴轶群, 及佳, 谢国勇, 吴刚, 朱艳
(中国药科大学 中药资源学教研室, 南京 210009)

[摘要] 目的:从 DNA 分子水平分析不同产地猫豆的遗传多样性,探索其相互之间的亲缘关系。方法:采用简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术对 11 份不同产地猫豆进行聚类分析,ISSR-聚合酶链式反应(PCR)扩增程序为 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 45 s,48 ~ 54 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 90 s,40 个循环,72 ℃ 延伸 7 min,10 ℃ 保存。在单因素试验基础上,通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验考察 ISSR-PCR 的 5 个主要因素(Mg^{2+} ,引物,dNTPs,模板 DNA 及 *Taq* 聚合酶)。运用 Ntsys-pc 软件和 Popgene 软件对 11 份样品进行分析。结果:ISSR-PCR 反应最佳体系为模板 DNA 20 ng,0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物,0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs,2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,1 U *Taq* DNA 聚合酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$),PCR 缓冲液 2 μL ,加入灭菌水至 20 μL 。从 40 条 ISSR 引物中筛选出 10 条扩增条带清晰且重复性良好的引物,共扩增出 97 个条带,其中多态性条带 25 条,多态性位点比率 25.8%。11 份猫豆资源间的遗传相似系数 0.866 ~ 0.969 1,聚类分为 3 个大类群。结论:猫豆遗传差异与地理分布有一定关系,但整体遗传变异小,遗传稳定性强。

[关键词] 猫豆; ISSR 分子标记; 遗传关系; 聚类分析
[中图分类号] R282.5; R931.2; R931.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)06-0086-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015060086
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150127.1149.008.html>
[网络出版时间] 2015-01-27 11:49

Inter-simple Sequence Repeat Analysis for Genetic Polymorphism of *Mucuna pruriens* from Different Habitats QIU Ya-ling, QIN Min-jian*, DAI Yi-qun, JI Jia, XIE Guo-yong, WU Gang, ZHU Yan
(Department of Resources Science of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze genetic diversities of *Mucuna pruriens* from different habitats according to their DNA molecule and investigate genetic relationships among them. **Method:** Inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular marker technique was adopted to analyze genetic diversity of *M. pruriens* from different habitats, ISSR-polymerase chain reaction (PCR) amplification procedure was as following: preliminary denaturation at 94 ℃ for 4 min; 40 cycles each involved denaturation at 94 ℃ for 45 s, annealed at 48-54 ℃ for 1 min and extended 90 s at 72 ℃; extended at 72 ℃ for 7 min and kept at 10 ℃. Based on single factor tests, effects of five main reaction elements (Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, dNTPs, template DNA and primers) on ISSR-PCR were optimized by orthogonal test. Eleven samples was analyzed by Ntsys-pc and Popgene software. **Result:** Optimum reaction system was as following: template DNA of 20 ng, ISSR primers of 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTPs of 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgCl_2 of 2.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* DNA polymerase of 1 U with 5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, PCR buffer of 2 μL , adding sterilized water to 20 μL . Ten ISSR primers with good repeatability and clear loci were selected from 40 primers and used for ISSR amplication, 97 loci were amplicated, in which 25 were polymorphic loci, accounting for 25.8%. Genetic similarity coefficient of 11 samples was 0.866 0-0.969 1 and samples could be classified into three groups. **Conclusion:** Genetic variation of *M. pruriens* has a close relationship with geographical distribution, but genetic variation is small with strong genetic stability.

[Key words] *Mucuna pruriens*; inter-simple sequence repeat molecular markers; genetic relationships; cluster analysis

[收稿日期] 20140710(009)
[第一作者] 邱亚玲,在读硕士,从事生药学研究,Tel:18252095070,E-mail:qiuyaling0907@126.com
[通讯作者] * 秦民坚,教授,博士生导师,从事中药资源与开发研究,Tel:025-86185130,E-mail:minjianqin@163.com

猫豆又名狗爪豆、黧豆、龙爪黧豆^[1],具有镇静安眠、抗糖尿病、治疗男性不育症^[2-3]等作用,主要活性成分为左旋多巴,治疗帕金森病疗效显著,具有较大的药用开发价值,同时富含蛋白质,营养价值高^[4]。猫豆主要分布在热带、亚热带地区,我国境内主要集中在华南、云南、贵州等地^[5],目前以人工栽培居多,黔西南部分石山区及广西部分山区均有种植。研究发现不同产地猫豆中药效成分含量差异较大^[6],而中药材质量的差异突出体现在遗传变异水平差异、环境因子及种植栽培手段差异等方面^[7]。其中分子水平上的遗传差异会导致化学成分多样性的分化,对猫豆活性成分具有决定性的影响,但目前尚无从分子水平揭示不同产地猫豆遗传差异的研究报道。分子标记技术作为一种准确、快速、简捷的分子水平种子质量检测技术,具有信息量大、不受季节限制等优点,在植物遗传育种领域得以广泛应用^[8],对中药材的鉴定^[9]、种质资源研究^[10]、遗传谱图构建等具有重要意义。

简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术兼具简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)、随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等分子标记的优点^[8],不需要预先获知序列信息,成本较低,且多态性丰富、重复性高、稳定性好、易操作,已被广泛应用于种质资源鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性及系统发育研究等方面,如紫藤^[11]、刺槐^[12]、大豆^[13]、甘草^[14]等植物的遗传多样性鉴别等。

本实验拟采用 ISSR 分子标记技术,通过考察镁离子、引物、模板 DNA 及 dNTPs 等因子的浓度,建立并优化猫豆的 ISSR-聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系,分析 11 个产地猫豆的遗传多样性,探讨猫豆种源间的亲缘关系,为该药材的引种栽培、资源保护和选种育种提供参考。

1 材料

Centrifuge 5417R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司),BT214D 型分析天平(德国赛多利斯公司),9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),Gel DocTM XR+型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。Taq DNA 聚合酶,PCR 缓冲液,dNTPs,引物,Marker 均购自上海生工生物工程有限公司;三羟甲

基氨基甲烷(Tris,国药集团化学试剂有限公司),乙二胺四乙酸钠盐(EDTA,南京化学试剂有限公司),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,上海生工生物工程有限公司),β-巯基乙醇(南京生兴生物技术有限公司),Glod View I 型核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司),水为灭菌双蒸水。

11 个产地的猫豆种子发芽的新鲜嫩叶分别采自广东(梅州、阳江)、四川(资阳、自贡)、广西(巴马、田东、都安、桂林、柳州及百色)、日本茨城,依次编号 1-11,均经中国药科大学中药资源教研室秦民坚教授鉴定为豆科植物黧豆 *Mucuna pruriens* var. *utilis*,凭证标本存于中国药科大学中药资源教研室。

2 方法

2.1 总 DNA 提取 采用改良 CTAB 法^[15-16]提取 11 个产地猫豆叶片总 DNA,电压 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,见图 1。DNA 经紫外纯度鉴定后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

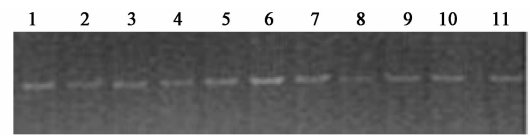


图 1 不同产地猫豆的总 DNA 电泳谱
Fig. 1 Total DNA electrophoresis spectrum of *Mucuna pruriens* from different habitats

2.2 ISSR-PCR 扩增反应体系的建立与优化 在单因素试验基础上,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验考察 ISSR-PCR 的 5 个主要因素(Mg^{2+} , 引物, dNTPs, 模板 DNA 及 Taq 聚合酶),试验安排见表 1,结果见图 2。显示 16 个组合中 2,7,8,10 扩增出的条带清晰且多态性较高。综合考虑扩增条带的质量及试剂用量等问题,确定 ISSR-PCR 反应最佳体系为条件 2,即总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中含模板 DNA 20 ng , $0.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, $0.15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs, $2.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 1 U Taq DNA 聚合酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),PCR 缓冲液 $2\text{ }\mu\text{L}$,加入灭菌水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3 ISSR-PCR 扩增程序^[11-14] $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s , $48\sim 54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s , 40 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min , $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 引物筛选^[11-14,17-18] 从加拿大 British Columbia 大学提供的 ISSR 引物序列表中挑选了 40 条引物,按 2.2 和 2.3 项下确定的反应体系及程序对所有样品进行 PCR 扩增。通过对 40 条引物的多次反复筛选,得到可有效扩增的引物 10 条,见表 2。以 11 个产地的猫豆总 DNA 为模板,分别用已选出的 10 条

表 1 猫豆 PCR 反应体系优化正交试验安排

Table 1 Orthogonal test arrangement for PCR reaction system of *Mucuna pruriens*

No.	Mg ²⁺ 浓度 /mmol·L ⁻¹	引物浓度 /μmol·L ⁻¹	dNTPs 浓度 /mmol·L ⁻¹	Taq DNA 酶/U	模板 DNA /ng
1	2.4	0.2	0.10	0.5	10
2	2.4	0.3	0.15	1.0	20
3	2.4	0.4	0.20	1.5	30
4	2.4	0.5	0.25	2.0	40
5	2.6	0.2	0.15	1.5	40
6	2.6	0.3	0.10	2.0	30
7	2.6	0.4	0.25	0.5	20
8	2.6	0.5	0.20	1.0	10
9	2.8	0.2	0.20	2.0	20
10	2.8	0.3	0.25	1.5	10
11	2.8	0.4	0.10	1.0	40
12	2.8	0.5	0.15	0.5	30
13	3.0	0.2	0.25	1.0	30
14	3.0	0.3	0.20	0.5	40
15	3.0	0.4	0.15	2.0	10
16	3.0	0.5	0.10	1.5	20

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

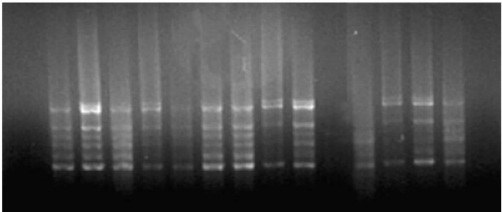


图 2 猫豆 PCR 反应体系正交试验样品(1~16)电泳谱
Fig.2 Electrophoresis spectrum of *Mucuna pruriens* samples(1-16) in orthogonal design

不同引物进行扩增,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 Glod View I 型核酸染色剂 0.1 mL·L⁻¹)于 5 V·cm⁻¹电泳,凝胶成像系统观察拍照。

2.5 数据处理 对扩增的电泳谱带进行统计,根据相同迁移率条带的有无统计条带的二元数据,有条带的记为 1,无条带的记为 0。利用 Popgene32 软件按照默认参数计算不同产地猫豆的多态位点率,观察等位基因数、有效等位基因数、遗传一致度及 Nei's 基因多样性指数,Nei's 遗传距离,Shannon's 信息指数,运用 NTSYS-pc version 2.1 软件按非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)进行聚类分析。

表 2 猫豆 ISSR 引物序列及扩增

Table 2 Amplification information of ISSR primers in *Mucuna pruriens*

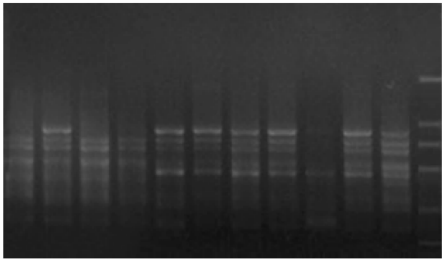
编号	引物序列	退火温度 /℃	总条带数	多态性 条带数	多态性 占比/%
UBC810	(GA) ₈ T	52	9	2	22.2
UBC811	(GA) ₈ C	54	9	2	22.2
UBC812	(GA) ₈ A	51	9	1	11.1
UBC842	(GA) ₈ YC	52	10	2	20.0
UBD808	(AG) ₈ C	52	8	1	12.5
UBC840	(GA) ₈ YT	52	11	1	9.1
UBC836	(AG) ₈ YA	52	15	6	40.0
UBC856	(AC) ₈ YA	54	9	3	33.3
UBC834	(AG) ₈ YT	52	9	3	33.3
UBC855	(AC) ₈ YT	54	8	4	50.0

注:Y=(C/T),表示简并碱基代码。

3 结果与分析

3.1 多态性分析 从 40 条 ISSR 引物中筛选出 10 条具有鉴别意义的多态性引物,在 11 个不同产地的猫豆药材中共检测出 97 个位点,72 条是单态的,25 条为多态的,多态性位点比率 25.8%。选用的 10 条 ISSR 引物对 11 个产地猫豆材料的扩增结果见表 2。ISSR 扩增产物片段大小在 2 000~250 bp。不同引物扩增出的总条带、多态性条带等均存在一定差异。UBC836 引物扩增出的条带数最多,达 15 条,其中多态性条带 6 条,占 40%。引物 UBC808 和 UBC836 扩增结果见图 3,4。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



11-11. 不同产地样品;M. Marker DL2000(图 4 同)
图 3 UBC808 引物对 11 个产地猫豆总 DNA 的扩增谱
Fig.3 Amplification spectrum of total DNA in *Mucuna pruriens* from 11 habitats with primer of UBC808

3.2 遗传多样性分析 Popgene 分析表明 11 个产地猫豆间遗传距离的变异范围 0.031 4~0.143 9,遗传一致性在 0.866 0~0.969 1,见表 3。多态位点率 25.8%,Nei's 基因多样性指数 0.086 6,Shannon's 信息指数 0.133,观察等位基因数和有效

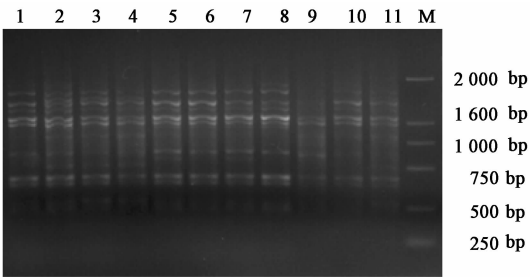


图 4 UBC836 引物对 11 个产地猫豆总 DNA 的扩增谱
Fig. 4 Amplification spectrum of total DNA in *Mucuna pruriens* from 11 habitats with primer of UBC836

表 3 不同产地猫豆遗传距离(左下角)及遗传相似系数(右上角)

Table 3 Genetic distance(lower left corner) and genetic similarity coefficient(upper right corner) of *Mucuna pruriens* from 11 habitats

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0.896 9	0.876 3	0.866 0	0.927 8	0.896 9	0.907 2	0.886 6	0.886 6	0.866 0	0.886 6
2	0.108 8		0.896 9	0.886 6	0.866 0	0.876 3	0.886 6	0.886 6	0.886 6	0.866 0	0.866 0
3	0.132 1	0.108 8		0.969 1	0.866 0	0.917 5	0.886 6	0.886 6	0.886 6	0.907 2	0.866 0
4	0.143 9	0.120 4	0.031 4		0.855 7	0.927 8	0.896 9	0.896 9	0.896 9	0.896 9	0.876 3
5	0.074 9	0.143 9	0.143 9	0.155 9		0.927 8	0.958 8	0.896 9	0.917 5	0.876 3	0.917 5
6	0.108 8	0.132 1	0.086 1	0.074 9	0.074 9		0.969 1	0.927 8	0.948 5	0.907 2	0.927 8
7	0.097 4	0.120 4	0.120 4	0.108 8	0.042 1	0.031 4		0.938 1	0.958 8	0.917 5	0.958 8
8	0.120 4	0.120 4	0.120 4	0.108 8	0.108 8	0.0749	0.063 9		0.917 5	0.876 3	0.958 8
9	0.120 4	0.120 4	0.120 4	0.108 8	0.086 1	0.052 9	0.042 1	0.086 1		0.938 1	0.958 8
10	0.143 9	0.143 9	0.097 4	0.108 8	0.132 1	0.097 4	0.086 1	0.132 1	0.063 9		0.917 5
11	0.120 4	0.143 9	0.143 9	0.132 1	0.086 1	0.074 9	0.042 1	0.042 1	0.042 1	0.086 1	

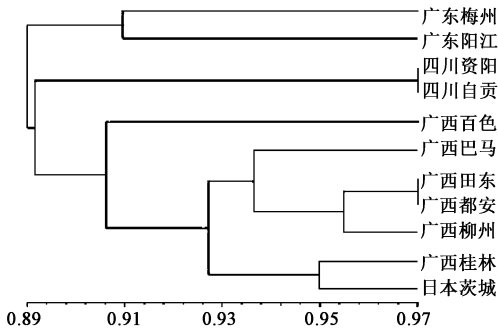


图 5 不同产地猫豆的 ISSR 聚类分析树状
Fig. 5 Dendrogram of ISSR analysis on *Mucuna pruriens* from 11 habitats

聚类分析图可大致将猫豆 11 个产地聚为 3 类,分别为广东省、四川省和广西省的猫豆,其中日本猫豆与广西猫豆聚为一类,这可能是因为日本猫豆源于广西猫豆引种,并且引种历史不长,还未发生遗传变异。

本文利用 10 条引物对 11 个产地猫豆总 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 97 个条带,多态性条带

等位基因数分别为 1.268,1.139。
3.3 聚类分析 利用 Ntsys-pc 软件按 UPGMA 对 11 份猫豆样品进行聚类分析,见图 5。结果显示不同产地猫豆间的遗传相似系数在 0.866 0~0.969 1。在遗传相似系数为 0.90 附近,11 份猫豆样品被聚为三大类,分别是广东、四川及广西的猫豆,其中日本猫豆和广西猫豆聚为一类。

4 讨论
一般认为,植物种群间的遗传变异与该物种的地理分布和生态特性有关,本试验结果符合此观点。

25 条,多态性位点比率 25.8%。遗传距离、遗传一致性及 Nei's 基因多样性指数等数据均表明不同产地猫豆间亲缘关系较近,遗传差异小,遗传较为稳定。原因可能是①市场需求及人工栽培。猫豆成作为左旋多巴提取物的主要来源,应市场需求,很多地区对猫豆进行大量人工种植,农民自留种植使其品种多样性严重退化。目前,猫豆药材几乎全部来源于人工栽培,这种人工栽培驯化及定向选择,使遗传差异越来越小,遗传基础日益狭窄。②植物的地理分布影响了其遗传多样性,一般而言,地理分布狭窄会阻碍物种间基因流,会使物种遗传基础相对狭窄^[19]。猫豆主产于热带、亚热带,主要种植地区集中在广西、四川等,地理分布并不广泛,这也限制了猫豆的遗传变异。③物种之间可通过花粉或种子为载体进行杂交而有基因渗入^[20],这种基因流的存在会使物种发生变异,丰富其遗传多样性^[21]。而豆科植物属于自花授粉,即猫豆进化过程中接受其他物种的基因渗入少,这也可能是导致不同产地猫豆遗

传多样性不高的原因之一。

蒋伟哲等^[6]测定了 5 个产地猫豆的左旋多巴含量,发现不同产地猫豆的左旋多巴含量存在较大差异,6.99% ~9.35% 不等,且石山地区左旋多巴含量高于地势平坦地区,可能是因为石山地区猫豆种植不需要搭架,地理环境条件更适合藤本类植物生长;而本文结果表明不同产地猫豆在分子水平上差异较小,亲缘关系较近,遗传较为保守,稳定性强。综上,产地间猫豆遗传差异小,但左旋多巴含量差异较大,说明遗传变异水平差异并非决定猫豆质量的首要因素,在考虑猫豆选种问题上,对种源产地无较高要求,对猫豆的质量控制应集中在优化环境因子及种植栽培手段等方面。猫豆的遗传稳定有利于保留其优良基因,降低了选种、留种的难度,对猫豆的引种栽培及推广种植等均具有积极意义,结合后期对环境因素及栽培手段等因素的控制,可保证猫豆的质量。

[参考文献]

[1] 李树刚. 中国植物志. 第 41 卷[M]. 北京:科学出版社,1995:183.

[2] 黄增琼,蒋伟哲,黄兴振,等. 猫豆胍镇静催眠和抗震颤麻痹作用研究[J]. 中草药,2009,40(2):276-279.

[3] Majekodunmi S O, Oyagbemi A A, Umukoro S, et al. Evaluation of the anti-diabetic properties of *Mucuna pruriens* seed extract[J]. Asian Pac J Trop Med,2011,4(8):632-636.

[4] 王慧忠,何翠屏. 喀斯特地区的高产饲料作物-狗爪豆[J]. 山地农业生物学报,1999,18(2):81-84.

[5] 覃初贤,陆平,王一平. 桂西山区食用豆类种质资源考察[J]. 广西农业科学,1996(1):26-28.

[6] 蒋伟哲,周燕文,吴闯,等. 不同产地猫豆中左旋多巴的含量比较[J]. 中草药,2000,31(11):860-862.

[7] 张永清,商庆新. 药用植物次生代谢与中药材 GAP [J]. 世界科学技术——中医药现代化,2005,7(2):67-73.

[8] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613-616.

[9] 刘霞,刘震,陈科力,等. 湖北麦冬及其近缘种的 ISSR

多样性研究[J]. 中药材,2010,33(7):1052-1055.

[10] Jing Z B, Wang X P. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European Cultivars based on ISSR markers [J]. Biochem Syst Ecol,2013,46:120-126.

[11] 龚和解. 部分紫藤属资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 上海农业学报,2013,29(4):52-55.

[12] 孙芳,杨敏生,张军,等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):91-96.

[13] 周延清,李敏,贾敬芬,等. 河南大豆遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报,2006,26(9):1883-1887.

[14] 李贝宁,南博,刘春生,等. 道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):90-93.

[15] 陈昆松,李方,徐昌杰,等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传,2004,26(4):529-531.

[16] 王振东,孙仓,王惠. 不同方法从大豆不同组织中提取基因组 DNA 效果的比较[J]. 大豆科学,2008,27(1):42-46.

[17] 曾亮,李敏权,杨晓明,等. 豌豆 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 草地学报,2012,20(3):536-539.

[18] 王海飞,关建平,马钰,等. 中国蚕豆种质资源 ISSR 标记遗传多样性分析[J]. 作物学报,2011,37(4):595-602.

[19] Liu X L, Qian Z G, Liu F H, et al. Genetic diversity within and among populations of *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Scrophulariaceae) in China, an endangered medicinal plant [J]. Biochem Syst Ecol,2011,39(4):297-301.

[20] Han J P, Zhang W S, Cao H B, et al. Genetic diversity and biogeography of the traditional Chinese medicine, *Gardenia jasminoides*, based on AFLP markers [J]. Biochem Syst Ecol,2007,35(3):138-145.

[21] Liu Y B, Wei W, Ma K P, et al. Consequences of gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and its relative[J]. Plant Sci,2013,211:42-51.

[责任编辑 刘德文]