

文章编号: 1000-5471(2008)01-0086-04

4 种叶型性状半夏和掌叶半夏的 ISSR 分析^①

李 磊¹, 陈 敏², 张 明³, 孙 敏¹, 廖志华¹

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 400715;
2. 西南大学 药学院, 重庆 400715; 3. 重庆中药研究院, 重庆 400065

摘要: 从 50 条 ISSR 引物中筛选到 5 条适合引物, 对 4 种叶型性状半夏和掌叶半夏进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳分析, 构建 5 种不同半夏的 DNA 指纹图谱. 结果表明: 5 条引物都能够分别扩增出多态性条带, 其中引物 UBC-868 具有较高的多态性, 可独自将所测的 5 种材料区分开. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)-PCR 作为一种简便、可靠的分子标记技术, 可以作为不同半夏鉴别的方法之一, 从而实现半夏种质资源分子水平的鉴定.

关键词: 半夏; 掌叶半夏; Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

中图分类号: Q949.71+7.2

文献标识码: A

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. 为天南星科 (Araceae) 半夏属重要药用植物, 块茎入药, 为中国药典(2005 年版一部)收录的唯一正品半夏药材, 具有燥湿化痰、消痞散结的功效^[1]. 掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott (别名天南星) 也是天南星科半夏属重要药用植物, 同样以块茎入药. 近年来, 由于临床应用广泛, 导致半夏野生种源破坏严重, 人工栽培将成为一种有效的替代途径. 但半夏种内有多种叶型变异, 且叶型与产品产量和质量关系密切, 因此开展基于 DNA 指纹图谱技术的半夏种内和种间的分子标记研究具有十分重要的意义, 而目前还罕见这方面的报道.

ISSR^[2] 以其简便迅速、多态性高、重复性好等优点被广泛应用于动植物的品种鉴定、DNA 指纹图谱构建和种质资源多样性研究等领域^[3,4], 特别是在中草药种内和种间鉴定等方面得到广泛运用. 因而采用 ISSR 方法对 4 种不同叶型的半夏和掌叶半夏进行 DNA 分子水平研究, 构建其 DNA 指纹图谱, 在分子水平上分析其遗传差异, 为不同叶型的半夏提供了一种简便可靠的分子鉴定方法, 同时对于半夏品种选育有一定的指导意义.

1 材料与方 法

1.1 植物材料

新鲜芍叶型半夏、桃叶半夏、双珠芽半夏和白叶柄半夏 4 种不同叶型性状半夏及掌叶半夏的嫩叶(表 1), 由重庆市中药研究院张明研究员鉴定并提供, 置于 -70 °C 超低温冰箱中保存备用.

1.2 方 法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取

由经典的 CTAB 法^[5] 稍加改良, 即在粗提过程中连续 2 次用氯仿: 异戊醇(24:1), 提取上述 5 种半夏基因组 DNA.

1.2.2 基因组总 DNA 的质量与浓度检测

取 5 μ L DNA 于 1% 琼脂糖凝胶上, 电泳检测 DNA 的大小和完整性. 将 DNA 稀释 100 倍后, 在紫外下 260nm 测定 DNA 浓度.

① 收稿日期: 2007-09-04

基金项目: 国家科技基础平台工作资助项目.

作者简介: 李 磊(1981-), 女, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学及药用植物生物技术研究.

通讯作者: 陈 敏.

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系及凝胶电泳

ISSR 引物序列参考 University of British Columbia 提供的标准序列, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

选芍药叶型半夏 DNA 进行预实验, 从 50 条引物中筛选出 5 条能够获得信号强, 背景清晰, 反应稳定的 ISSR 引物(表 2)。PCR 最佳反应体系为 25 μL : 5 U Taq 酶, 10 mM dNTPs, 25 mM MgCl_2 , 10 \times Taq buffer 2.5 μL , 模板 DNA 25 ng, 35 μM 引物 0.5 μL , 其余用灭菌去离子水补齐。

PCR 反应在 MyCycler(BioRad)上进行, 筛选出的引物用于 ISSR 扩增, 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, (41~51.2) $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 min, 39 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 41 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。






对于有简并碱基的引物, 根据计算出的退火温度, 在梯度 PCR 仪上, 上下浮动 10 $^{\circ}\text{C}$ 左右随机生成 8 个温度, 按照以上的 PCR 体系和程序扩增。

电泳以 0.5 \times TAE 缓冲液(Tris-乙酸盐和 EDTA 缓冲液, pH 8.0)配置 2% 琼脂糖凝胶, 再加入适量 Gold View 染色, 在含有 0.5 \times TE 缓冲液的 4 V/cm 恒压下电泳 1.5 h 中进行。PCR 产物点样量为 5 μL , Maker 为 DL 2 000, 用凝胶成像系统(Transilluminator2020D)观察, 拍照, 记录并保存电泳图片。

1.2.4 数据统计与分析

根据 ISSR 扩增条带的有无, 分别以 1 和 0 表示。在相同迁移位置, 有条带记为 1, 无条带记为 0。用 SPSS11.0 分析软件的 Euclidean 方法计算样品间的遗传距离, 用 within-group linkage 聚类分析, 建立样品间的亲缘关系树。利用 POPGENE32 计算 ISSR 扩增产物间的 Shannon 多态性指数 PIC(polymorphism information content), 系统标记的有效等位基因数 N_e (effective number of alleles), Shannon 表型信息指数 I 和多态性条带百分率 P。

表 1 5 种供试半夏叶型表

编号	叶型名称	拉丁学名	叶型照片
1	芍药型半夏	<i>Panacis sibirica</i> Turcz. et Griseb.	
2	牡丹半夏	<i>Panacis sibirica</i> Turcz. et Griseb.	
3	芍药型半夏	<i>Panacis sibirica</i> Turcz. et Griseb.	
4	芍药型半夏	<i>Panacis sibirica</i> Turcz. et Griseb.	
5	掌叶半夏	<i>Panacis palmifera</i> Sieber. et Zucc.	

2 结果和分析

2.1 基因组 DNA 浓度与纯度

在核酸/蛋白分析仪(Beckman Du530DNA/Protein Analyzer)上紫外检测 5 种半夏的基因组质量, 其 OD260/OD280 均在 1.80 左右, 质量较高; 基因组 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 基因组 DNA 较为完整, 达到分子标记要求(图 1, 其顺序同表 1), 可用于 ISSR 标记。将其浓度稀释至 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 左右, 便于 PCR 反应。

2.2 ISSR-PCR 扩增产物多态性分析

所筛选获得的 5 条引物都能够从 5 种不同的半夏 DNA 扩增出清晰条带并产生具有差异性的特征图谱; 其中引物 UBC-876 扩增获得最为丰富的条带, 具有较高的多态性比率, 该引物扩增产生的特征性 DNA 指纹图谱完全可以用于这 5 种半夏的分子鉴定(图 2). 5 个 ISSR 引物共扩增出 41 条带. 基于这些条带, 用 POPGENE32 软件分析得: 多态性指数为 0.3522, 有效等位基因为 1.5437, 信息表型指数为 0.488 2, 多态性条带百分率为 60.31%(表 2). 扩增条带的分子量从 300 bp~1 800 bp 不等, 特别是含有简并碱基的引物 UBC-855, 由梯度 PCR 仪上扩增结果可知在 52.10 °C 时可产生多态性条带. 故在此合适的退火温度时对 5 种试验材料分别进行 PCR 操作, 结果也可将 5 种半夏分别区分开.

表 2 ISSR 引物及扩增结果

引物	序列	退火温度/°C	条带	多态性条带	多态率/%	多态性指数	有效等位基因数
UBC-868	(GAA) ₆	42.80	14	12	85.71	—	—
UBC-876	(GATA) ₂ (CATA) ₂	41.00	7	5	71.43	—	—
UBC-878	(GGAT) ₄	43.00	8	5	62.50	—	—
UBC-855	(AT) ₈ YT	52.10	6	4	66.67	—	—
UBC-864	(ATG) ₆	42.80	6	3	50.00	—	—
总计	—	—	41	29	70.73	0.352 2	1.543 7

Y=(C, T); 5'→3'

2.3 ISSR 指纹图谱的建立

利用筛选得到的 5 个 ISSR 引物分别对材料进行扩增, 建立了 ISSR 指纹图谱, 且 UBC-876 能单独区分这 5 种不同供试材料. 从图 1 可知, UBC-868 对这些材料扩增模式有很大差异, 从而可将所有被测样品轻易区分开. 另外, 在 850 bp 左右均有清晰的条带, 但条带位置略有差异, 可能是半夏属中进化比较保守的区域, 对其进一步分析可能会揭示出关于系统进化上的证据. 由筛选引物的 PCR 扩增结果可知, 不同叶型之间具有不同的谱带类型. 这说明不同供试材料在 DNA 水平上存在遗传差异. 即使在亲缘关系非常相近的不同叶型间也能找到差异条带进行明显区分. ISSR 方法可以实现对各供试材料的 DNA 水平鉴别, 建立其分子鉴别体系.

2.4 ISSR 聚类分析

5 种不同材料的遗传一致度(I)和遗传距离(D)见表 3, 其遗传一致度(I)的变化范围为 0.876 0~0.953 2, 平均值为 0.912 7, 遗传距离(D)的变化范围是 0.047 0~0.132 0, 其平均值为 0.086 1, 表明 5 个材料间的遗传关系很近, 但存在一定的变异. 根据 Nei's 遗传距离用 UPGMA 法绘成图 2, 更加直观. 由图 2 中可以看出, ISSR 能够反映各供试材料之间的遗传距离. 掌叶半夏与其它 4 个材料之间的遗传距离都较大, 半夏的 4 个不同叶型中, 白叶柄半夏的变异是最大的, 桃叶形半夏和白叶柄半夏的遗传一致度最高. 这与其在生理上、形态上的差异基本一致, 说明了遗传本质差异对外部表型特征的对应反映, 较准确地确立了它们之间的亲缘关系和遗传距离.

3 讨论

ISSR-PCR 反应体系对模板、引物浓度、Mg²⁺ 浓度及复性温度(Ta)较敏感, 其中特别是 Mg²⁺, 用于激活 DNA 聚合酶, 适宜的浓度对 PCR 扩增结果的一致性是很关键的. Ta 的高低也对 PCR 反应有

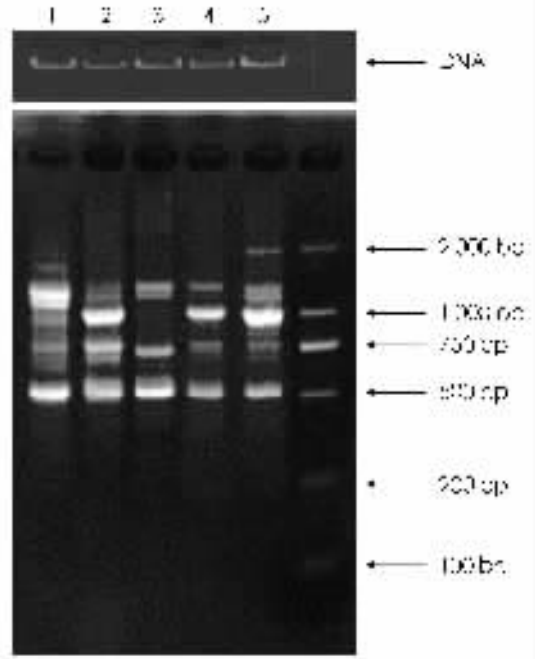


图 1 5 份供试材料基因组 DNA 及引物 UBC-876 PCR 结果

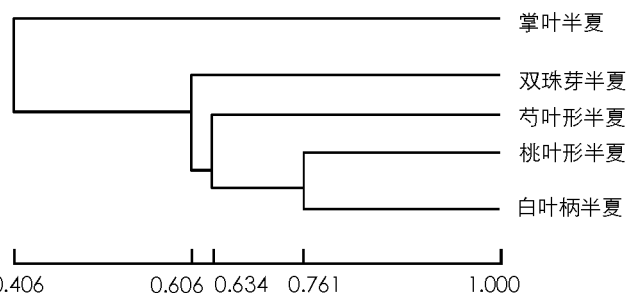


图 2 5 份供试材料间的 UPGMA 遗传关系聚类图

较大影响,若 Ta 太低,引物将产生非特异性复性,致使特异性 DNA 片段增多;若 Ta 太高,引物与模板不能很好复性,导致扩增效率非常低,故每条 ISSR 引物合适的复性温度对 ISSR-PCR 结果的重复性较重要。模板,引物浓度对 PCR 反应影响也较大。这与前人的研究结果相似^[6]。基因组 DNA 的充分解旋对 ISSR-PCR 反应影响较大,在适宜的温度和时间内完成,PCR 反应才能顺利进行,所以优化 ISSR-PCR 反应程序也较关键。

表 3 供试材料间的 Nei's 遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

popID	1	2	3	4	5
1	* * * *	0.940 7	0.918 2	0.927 5	0.891 2
2	0.061 0	* * * *	0.953 2	0.920 7	0.889 8
3	0.085 2	0.047 0	* * * *	0.915 6	0.876 0
4	0.074 5	0.072 3	0.088 9	* * * *	0.894 5
5	0.116 4	0.116 4	0.132 0	0.111 3	* * * *

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 78.
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176 - 183.
- [3] 李进波, 江良荣, 李春海, 等. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析比较 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 42 - 47.
- [4] 钱 韦, 葛 颂, 洪德元, 等. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741 - 750.
- [5] 陈 敏. 五味子科药用植物的抗艾滋病病毒活性成分和 ISSR 分子标记 [D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [6] 沈 洁, 丁小余, 丁 鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究 II ISSR 指纹标记方法的建立与优化 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291 - 294.

The Analysis of Germplasms Evaluation of Four Different Leaf Types and Characters of *Pinellia ternata* and *Pinellia pedatisecta* by ISSR

LI Lei¹, CHEN Min², ZHANG Ming³,
SUN Min¹, LIAO Zhi-hua¹

1. Key Laboratory of Eco - environments in Three Gorge Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Five appropriate primers were selected from fifty inter simple sequence repeats (ISSR) polymerase chain reaction primers and tested for PCR and sepharose electrophoresis to design DNA fingerprints of *Pinellia pedatisecta* and four leaf types of *Pinellia ternata* to investigate the differences among them at DNA molecule level. The five primers amplified polymorphic bands separately, and the primer UBC-868, with higher polymorphic bands ratio, was able to distinguish all the examined materials. The ISSR-PCR provides a quick, reliable molecular technique for the identification of different leaf types of *Pinellia ternata*.

Key words: *Pinellia ternata*; *Pinellia pedatisecta*; Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)