

# 广西产鸡血藤遗传多样性的RAPD与ISSR标记方法的比较研究<sup>△</sup>

田 辉\*,蒋嫦月,朱 华,王孝勋,周 敏,崔 健,封 毅<sup>#</sup>(广西中医药大学药学院,南宁 530001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4348-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.10

**摘要** 目的:比较随机扩增多态性DNA分子标记技术(RAPD)和简单重复序列间区扩增技术(ISSR)两种标记方法,研究广西不同居群鸡血藤遗传多样性的优劣。方法:分别采用RAPD和ISSR标记方法,利用POPGENE 32软件、NtSys软件、SPSS 17.0软件,对广西不同采集地的9份鸡血藤的遗传多样性进行研究。结果:筛选出的3条RAPD引物及4条ISSR引物扩增后,共得到198和315个位点,多态性位点37和80个,多态性位点比率为18.7%和25.4%,有效等位基因数为1.416 8、1.584 0,基因多样性指数为0.269 4、0.351 3,Shannon多样性指数为0.431 6、0.529 9。ISSR标记均高于RAPD标记,RAPD和ISSR的平均遗传相似系数为0.757 64、0.683 80,表明ISSR检测遗传多样性更灵敏。二者的聚类结果相近,相关系数 $r$ 为0.847,说明其在0.001水平呈极显著正相关。结论:ISSR标记方法比RAPD标记反映出更多的遗传多样性信息,更适合于广西产不同居群鸡血藤的遗传多样性研究。

**关键词** 广西产鸡血藤;随机扩增多态性DNA分子标记技术;简单重复序列间区扩增技术;遗传多样性

## Comparative Study of Genetic Diversity of *Spatolobi caulis* from Guangxi by RAPD and ISSR Method

TIAN Hui, JIANG Chang-yue, ZHU Hua, WANG Xiao-xun, ZHOU Min, CUI Jian, FENG Yi (School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare genetic diversity of *Spatolobi caulis* from different areas of Guangxi by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR). METHODS: Through using POPGENE 32 software, NtSys software and SPSS 17.0 software, RAPD and ISSR methods were used to study genetic diversity of 9 samples of *S. caulis* from different areas of Guangxi. RESULTS: After amplification of screened 3 RAPD primers and 4 ISSR primers, and there were 198 and 315 locus, and 37 and 80 polymorphism locus. Rates of polymorphism locus were 18.7% and 25.4%; the number of effective alleles were 1.416 8 and 1.584 0; genetic diversity index were 0.269 4 and 0.351 3; Shannon diversity index were 0.431 6 and 0.529 9. All the values of ISSR marker were higher than RAPD marker. The average genetic similarity coefficient of ISSR and RAPD were 0.757 64 and 0.683 80, indicating ISSR was more sensitive for the detection of genetic diversity. The clustering result of them was close to each other. The correlation coefficient of them were 0.847, indicating very significant positive correlation at the level of 0.001. CONCLUSIONS: ISSR could reflect more information of genetic diversity than RAPD, and is more suitable for research of genetic diversity of *S. caulis* from different areas of Guangxi.

**KEYWORDS** *Spatolobi caulis* from Guangxi; Random amplified polymorphic DNA; Inter-simple sequence repeat; Genetic diversity

鸡血藤为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的干燥藤茎,具有补血、活血、通络的功能<sup>[1]</sup>。鸡血藤主要分布于广西云南,是广西的道地药材之一,近年鸡血藤资源枯竭现象比较明显,人工种植鸡血藤正在研究之中。利用分子标记的方法研究植物遗传多样性和种植资源分析,对选育优良品种和合理利用资源有着重要的指导作用。随机扩增多态性DNA分子标记技术(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列间区扩增技术(Inter-simple sequence repeat, ISSR)都是常用的分子标记技术,二者在原理、引物等方面有各自的优缺点。RAPD是由Welsh J等<sup>[2]</sup>建立的一项分子标记

技术,用任意序列的10个碱基寡核苷酸作为引物在全基因组上扫描,不需要预知基因组的序列信息,可提供无限量的信息,而且其DNA用量少、技术简单易行<sup>[3]</sup>。ISSR是以简单重复序列标记技术(SSR)为基础<sup>[4]</sup>,用锚定的微卫星DNA为引物,即在SSR序列的3'端或5'端加上2~4个随机核苷酸,在聚合酶链反应(PCR)中,锚定引物可以引起特定位点退火,导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间DNA片段进行PCR扩增,然后通过电泳技术分析其多样性结果<sup>[5]</sup>,具有重复性好、稳定性高、多态性丰富等优点<sup>[6]</sup>。近年来ISSR被广泛用在很多中药种植资源的研究上,如新疆贝母<sup>[7]</sup>、石斛<sup>[8]</sup>、三七<sup>[9]</sup>、山药<sup>[10]</sup>、麻黄<sup>[11]</sup>等。广东有采用RAPD对鸡血藤遗传多样性进行分析<sup>[12]</sup>,但未见利用RAPD和ISSR对广西产的鸡血藤进行遗传多样性分析比较的报道。本研究采用RAPD和ISSR对广西产鸡血藤的遗传多样性进行分析,比较这两个方法的优缺点,并为广西产鸡血藤的遗传多样性提供试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TGL-16G高速台式离心机(上海医用分析仪器厂);BP211D电子分析天平(德国赛多利斯公司);DYY-5稳压稳流电泳仪

<sup>△</sup> 基金项目:广西自然科学基金面上项目(No.2012GXNSFAA-053117);广西自然科学基金创新研究团队项目(No.2011GXNS-FF018006);广西壮瑶药重点实验室(No.桂科基字[2014]32号);壮瑶药协同创新中心(No.桂教科研[2013]20号);广西重点学科(壮药学)(No.桂[2013]16号)

\* 教授。研究方向:中药品种鉴定与质量评价。E-mail:377244732@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:副教授,博士。研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail:1277970221@qq.com

(北京市六一仪器厂);PCR仪(德国Biometra-Tgradient公司);BTS-20M UVI凝胶成像系统(英国Uvitec公司)。

### 1.2 试剂

DNA标记物(分子质量:109)、即用型的常规PCR预混合溶液(2×Taq PCR Master Mix,型号:KT201);植物基因组DNA提取试剂盒(型号:DP305)均由北京天根生化科技有限公司提供;50×核酸电泳(TAE)缓冲液(上海双螺旋生物科技有限公司);引物[英潍捷基(上海)贸易有限公司]。

### 1.3 药材

在广西区内共采集9份正品鸡血藤,其中5份栽培品、4份野生品(见表1)。经广西中医药大学药用植物教研室李斌副教授鉴定均为真品,标本存于本校中药鉴定教研室。

表1 广西产不同居群鸡血藤药材样品

Tab 1 Different population medical material sample of *K. interior* from Guangxi

| 编号 | 名称    | 采集地           | 采收时间       |
|----|-------|---------------|------------|
| 1  | 栽培鸡血藤 | 广西药用植物园       | 2011.6.14  |
| 2  | 栽培鸡血藤 | 广西中医药大学药圃     | 2011.11.20 |
| 3  | 栽培鸡血藤 | 广西南宁市上林县      | 2012.10.5  |
| 4  | 栽培鸡血藤 | 广西柳州花红基地      | 2012.10.27 |
| 5  | 栽培鸡血藤 | 广西贺州灵峰药业基地    | 2013.1.25  |
| 6  | 野生鸡血藤 | 广西南宁市三塘镇同仁村   | 2011.9.28  |
| 7  | 野生鸡血藤 | 广西防城港市上思县十万大山 | 2012.10.17 |
| 8  | 野生鸡血藤 | 广西南宁市隆安县龙虎山   | 2013.3.9   |
| 9  | 野生鸡血藤 | 广西桂林市永福县龙江乡   | 2013.3.21  |

## 2 方法

### 2.1 DNA提取与检测

样品采用改良的十六烷基三甲溴化铵(CTAB)法与植物基因组DNA试剂盒法结合提取DNA;用1.0%的琼脂糖电泳检测DNA的浓度和纯度。

### 2.2 引物筛选

扩增反应在PCR仪上进行。体系总体积为20 μl,采用一个DNA样品分别对40条RAPD引物和34条ISSR引物进行筛选,选择扩增稳定、清晰条带的引物进行正式扩增。

### 2.3 反应体系与扩增程序

通过对模板DNA浓度、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、Taq酶及退火温度等进行考察,得到了两种标记的最适反应体系和扩增程序。DNA模板与RAPD、ISSR引物进行PCR扩增,体系总体积为25 μl,2×Taq Master Mix 12.5 μl,引物1 μl,DNA模板3 μl,加ddH<sub>2</sub>O至25 μl。扩增程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,36℃退火30 s,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸5 min。产物4℃保存,长期保存置于-20℃下。取扩增反应产物10 μl和2%琼脂糖凝胶,在1×TAE缓冲系统下,100 V下电泳45 min,溴化乙锭(EB)染色后,于凝胶成像系统观察、拍照。

### 2.4 统计学方法

两种标记方法得到的图谱,按谱带有强带和弱带记为1,无带记为0,得到原始数据。利用POPGENE 32软件计算RAPD和ISSR扩增产物的多态位点数、多态位点比率、Shannon多样性指数、有效等位基因数,并得出遗传相似系数矩阵。利用Ntsys软件构建RAPD和ISSR的聚类图。并用SPSS 17.0软件的双变量相关分析(Bivariate)法对两种标记的遗传相似系数矩阵进行相关性分析,比较两种标记方法所得出结

果的一致性。

## 3 结果

### 3.1 RAPD和ISSR扩增电泳结果

从40条RAPD引物中筛选出3条,用于正式扩增的引物序列为RAPD引物6号(RAPD6):AACGGTGTCC、8号(RAPD8):AGGATCGTCG、37号(RAPD37):TGATCGTGTG;从34条ISSR引物中筛选出4条,用于正式扩增的引物序列为ISSR引物10号(ISSR10):CACCACCACGC、16号(ISSR16):CGCC-GCCGCGC、18号(ISSR18):ACAACAACAGC、27号(ISSR27):CTCCTCCTCAT。利用提取出的广西产不同居群鸡血藤DNA模板分别与RAPD和ISSR引物进行PCR扩增,其中RAPD6和ISSR27的扩增电泳图见图1。

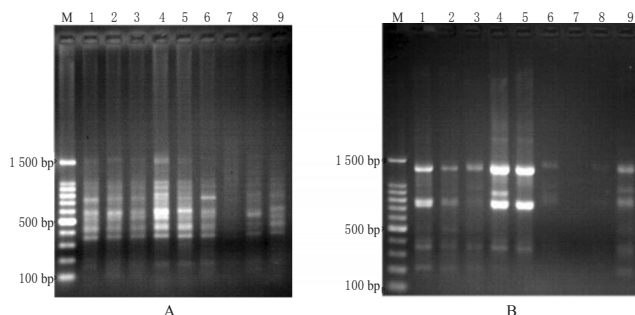


图1 RAPD6和ISSR27对广西产不同居群鸡血藤的扩增图谱

A.RAPD6;B.ISSR27;M.marker;1~9.鸡血藤样品编号

Fig 1 Amplification map of *K. interior* from different population in Guangxi by RAPD6 and ISSR27

A.RAPD6;B.ISSR27;M. marker;1-9. serial number of *K. interior*

### 3.2 两种标记方法的遗传分析结果

3.2.1 遗传多态性分析 结果表明,3条RAPD引物能扩增出多态性条带,4条ISSR引物也扩增出多态性条带,并且条带清晰、重复性好。RAPD和ISSR扩增产物的遗传数据结果见表2。

表2 RAPD和ISSR扩增产物的遗传数据

Tab 2 Genetic data of RAPD and ISSR amplification products

| 标记系统 | 条带大小, bp  | 总位点数 | 多态性位点数 | 多态性位点比率, % | 有效等位基因数 | 基因多样性指数 | Shannon多样性指数 |
|------|-----------|------|--------|------------|---------|---------|--------------|
| RAPD | 200~800   | 198  | 37     | 18.7       | 1.416 8 | 0.269 4 | 0.431 6      |
| ISSR | 200~1 000 | 315  | 80     | 25.4       | 1.584 0 | 0.351 3 | 0.529 9      |

3.2.2 遗传相似系数分析 RAPD和ISSR扩增产物的遗传相似结果见表3。

表3 RAPD和ISSR扩增产物的遗传相似结果

Tab 3 Genetic similarity coefficient of RAPD and ISSR amplification products

| 标记系统 | 总数 | 最小值   | 最大值   | 平均值      | 标准差       |
|------|----|-------|-------|----------|-----------|
| RAPD | 45 | 0.045 | 1.000 | 0.757 64 | 0.254 216 |
| ISSR | 45 | 0.171 | 1.000 | 0.683 80 | 0.247 533 |

3.2.3 聚类分析 RAPD和ISSR扩增产物的聚类树状图见图2。

3.2.4 RAPD和ISSR标记方法的遗传相似性分析 RAPD和ISSR两种分子标记方法分析结果的相关系数r为0.847,在

0.001水平呈极显著正相关。结果见表4<sup>\*\*</sup>表示在0.001水平(双尾检测)呈极显著正相关。

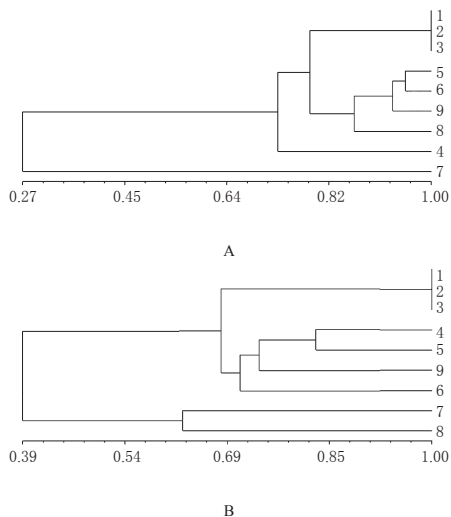


图2 RAPD和ISSR扩增产物的聚类树状图

A. RAPD; B. ISSR; 1~9. 鸡血藤样品编号

Fig 2 Cluster tree of RAPD and ISSR amplification products

A. RAPD; B. ISSR; 1-9. serial number of *K. interior*

表4 RAPD和ISSR标记方法的遗传相似性分析结果

Tab 4 Genetic similarity analysis by RAPD and ISSR

| 标记系统 | 项目                  | RAPD                | ISSR                |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|
| RAPD | 皮尔森相关系数( <i>r</i> ) | 1                   | 0.847 <sup>**</sup> |
|      | 显著性(双侧)             | 0                   | 0.000               |
|      | 总数                  | 45                  | 45                  |
| ISSR | 皮尔森相关系数( <i>r</i> ) | 0.847 <sup>**</sup> | 1                   |
|      | 显著性(双侧)             | 0.000               | 0                   |
|      | 总数                  | 45                  | 45                  |

## 4 讨论

### 4.1 遗传多态性

RAPD与ISSR两种标记方法均产生了各自有效的多态性带,表明二者均能反映样品丰富的遗传多样性。但条带分布范围、多态性位点比率、有效等位基因、基因多样性指数、Shannon多样性指数,ISSR标记均高于RAPD标记,这说明ISSR标记检测广西产不同居群鸡血藤样品遗传多样性的能力更强。

### 4.2 遗传相似系数

ISSR标记方法检测到的遗传相似系数小,而且其平均值小于RAPD标记,这说明ISSR标记对于广西产不同居群鸡血藤的遗传多样性检测得更灵敏,能检测到更多的个体间遗传差异。

### 4.3 聚类结果

RAPD与ISSR标记的聚类结果相似但不完全相同。来自南宁市区及近效县的栽培品都聚为了一类,而南宁三塘野生品与栽培品的距离稍远,这表明栽培品与野生品亲缘关系有一定的差异;贺州、桂林市样品在两个方法中遗传距离都较近,聚类较为紧凑;防城港市的样品与其他产地的样品之间遗传距离较大,表现出了较远的亲缘关系。两种标记方法中,上

林县和柳州市这两个产地的样品聚类结果存在一定的差异。这样的结果可能是由于RAPD引物是任意序列的10个碱基,而ISSR引物是15~24个碱基的重复锚定引物,不同标记方法的引物检测到的多态性不一样;而且多态性片段数随着引物数量的增加而增加,必然导致遗传距离的变化<sup>[4]</sup>。也可能是ISSR是显性标记,与RAPD相比,更能揭示多态性。

ISSR标记反映出广西产不同居群鸡血藤丰富的遗传多样性,此法可以明显区分广西区内不同居群的鸡血藤样品。

### 4.4 RAPD与ISSR标记方法的相似性

ISSR标记方法与RAPD标记方法之间的*r*为0.847,说明其在0.001水平呈极显著正相关,进一步验证了两种标记聚类结果的相似性。

综上所述,虽然分子标记技术繁多、各有利弊,但对于广西产不同居群的鸡血藤样品,ISSR标记方法相对来说反映了较多的遗传信息,检测出的遗传变异的灵敏度也高于RAPD标记,更适合于广西产不同居群鸡血藤的遗传多样性分析。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:180.
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24):7 213.
- [3] 郭宝林,戴波.中药材DNA分子标记研究的技术问题II: RAPD实验技术和方法学论述[J]. *中草药*, 2002, 33(2): 178.
- [4] 尚小河,刘峰群,袁海龙,等.中药DNA分子标识鉴定研究进展[J]. *中草药*, 2000, 31(8):561.
- [5] 张忠廉,张丽娟. SSR ISSR标记技术及其在生药学中的应用进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(11):79.
- [6] 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.
- [7] 王果平,樊丛照,李晓瑾,等.基于ISSR的新疆贝母属植物遗传多样性研究[J]. *中草药*, 2013, 44(7):887.
- [8] 卢家仕,卜朝阳,吕维莉,等.不同产地石斛属种质资源的ISSR遗传多样性分析[J]. *中草药*, 2013, 44(1):96.
- [9] 田斌,辛培尧,孙正海,等.三七ISSR-PCR反应体系建立及优化[J]. *云南农业大学学报:自然科学*, 2013, 28(1): 96.
- [10] 李齐向,华树妹,雷伏贵,等. ISSR和SRAP在山药遗传多样性分析上的应用比较[J]. *福建农业学报*, 2013, 28(9):876.
- [11] 朱田田,晋玲,杜戮,等.中麻黄ISSR-PCR反应体系的建立和优化[J]. *中国药房*, 2013, 24(43):4 033.
- [12] 翟明,刘军民,安冉.鸡血藤类药材种质资源的RAPD分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(4):413.

(收稿日期:2015-03-29 修回日期:2015-05-19)

(编辑:邹丽娟)