

# 四倍体黄芩及二倍体黄芩遗传差异的 ISSR 分析

柴俊雯<sup>1</sup>, 刘玉<sup>1</sup>, 陈红刚<sup>1</sup>, 朱田田<sup>1</sup>, 杜弢<sup>1,2,3\*</sup> (1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2.甘肃省中药质量与标准研究重点实验室, 兰州 730000; 3.甘肃中医药大学药用植物遗传育种研究所, 兰州 730000)

**摘要:** 目的 分析研究四倍体黄芩新品系 D20 和二倍体黄芩之间的遗传差异。方法 采用 ISSR 分子标记技术对四倍体黄芩及二倍体黄芩之间的遗传差异进行研究。结果 从 100 条引物中筛选得到 9 条 ISSR 引物用于正式扩增, 多态性百分率为 84.2%; 遗传距离的变异范围是 0.086 9~0.242 9, 聚类分析结果将黄芩样本分为两大类, 二倍体聚为一类, 四倍体聚为另一类。结论 四倍体黄芩新品系 D20 和二倍体黄芩存在明显的遗传差异, ISSR 分子标记能有效的揭示材料间的多态性。

**关键词:** 黄芩; 二倍体; 四倍体; 遗传差异; ISSR

中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0665-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.010

引用本文: 柴俊雯, 刘玉, 陈红刚, 等. 四倍体黄芩及二倍体黄芩遗传差异的 ISSR 分析[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 665-669.

## Analysis of Genetic Diversity Between Tetraploid and Diploid *Scutellaria Baicalensis* by ISSR Markers

CHAI Junwen<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, CHEN Honggang<sup>1</sup>, ZHU Tiantian<sup>1</sup>, DU Tao<sup>1,2,3\*</sup> (1.College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality and Standard in Gansu Province, Lanzhou 730000, China; 3.Institute of Medicinal Plant Genetics and Breeding, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the genetic variation between tetraploid and diploid *Scutellaria baicalensis*. **METHODS** ISSR molecular markers were used to study the genetic differences between tetraploid and diploid of *Scutellaria baicalensis*. **RESULTS** ISSR primers were screened from 100 primers for formal amplification, the percentage of polymorphism reached 84.2%. The variation range of genetic distance was 0.086 9-0.242 9. The UPGMA clustering tree divided the samples into two major groups. The diploid groups were clustered into one category, and the tetraploid were clustered into another. **CONCLUSION** There are genetic differences between tetraploid and diploid *Scutellaria baicalensis* Georgi, and ISSR molecular markers can effectively reveal the polymorphism among materials.

**KEY WORDS:** *Scutellaria baicalensis* Georgi; diploid; tetraploid; genetic diversity; ISSR

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科植物, 其药用部位为干燥根, 具有清热燥湿, 止血安胎等功效, 用于肺热咳嗽、胎动不安等症<sup>[1]</sup>。黄芩药材主产于我国华北地区, 甘肃亦为产区之一<sup>[2]</sup>。近年来市场上野生黄芩资源匮乏, 栽培品质量下降严重, 逐渐难以满足临床需求, 因此, 选育黄芩新品种尤为迫切<sup>[3]</sup>。中国药科大学高山林教授等采用组织培养的手段成功育出了高产优质的四倍体黄芩新品系 D20<sup>[4]</sup>。其四倍体虽然来源于二倍体, 但植株的外部形态及内在品质均有一定差异。

ISSR 标记技术已被广泛应用于品种鉴定、多样性分析、指纹图谱的构建等研究中。有学者利

用 ISSR 分子标记技术对果树刺梨及药用植物菘蓝、白术等植物的遗传差异性进行了研究, 结果表明其同源四倍体与二倍体之间存在较大的遗传差异<sup>[5-7]</sup>。目前, 对于四倍体黄芩新品系 D20 和普通二倍体黄芩之间的遗传差异的研究未见报道。本研究采用 ISSR 分子标记技术, 从 DNA 分子水平分析黄芩二倍体及其同源四倍体遗传结构差异, 为探讨黄芩多倍体诱变规律、基因表达调控以及遗传改良提供理论依据。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

提取 DNA 的新鲜叶片采自甘肃中医药大学和政药用植物园黄芩资源圃, 由杜弢教授鉴定为唇

基金项目: 甘肃省中药产业科技攻关项目(GYC12-05); 国家基本药物所需中药原料资源调查和监测项目(国中医药办规财发[2013]41)

作者简介: 柴俊雯, 女, 硕士生 Tel: 18298387332 E-mail: 1172546955@qq.com \*通信作者: 杜弢, 男, 硕士, 教授 Tel: (0931)8765393 E-mail: gslzdt@163.com

形科药用植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)。二倍体 3 个不同小区, 四倍体 3 个不同小区, 每个小区 10 份, 30 份四倍体黄芩和 30 份二倍体黄芩, 共 60 份黄芩样本。采集无病虫害新鲜嫩叶, 洗净、晾干, 置于干燥硅胶中带回实验室, -20 ℃ 冰箱保存备用, 具体编号见表 1。

### 1.2 仪器

PCR 扩增仪(德国 Biometra Technologies Sure cycler 8800); 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad); DYY-10 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 电泳槽(北京六一仪器厂); TGL16M 型台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); ZXLD-50KBS 型立体压力蒸汽灭菌器(上海精科实业有限公司); WFH-201B 紫外透射反射仪(上海精科实业有限公司); 水浴锅(江苏环保仪器厂); 精密电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

### 1.3 试剂

CTAB、EDTA、Tris、PVP、β-巯基乙醇均来自西安科昊生物工程有限责任公司; RNaseA、A-garose 琼脂糖、Gold View 核酸染料、TaqDNA 聚合酶均来自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; TBE 缓冲液、dNTPs、10×PCR buffer, 超纯水均来自西安科昊生物工程有限责任公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒(批号: B409DA0002, 上海生工生物工程有限公司); ISSR 引物根据 British Columbia 大学公布的序列设计, 由上海生工生物工程有限公司合成; 其他化学试剂均为国产分析纯。

## 2 方法

### 2.1 基因组 DNA 提取及检测

取植物新鲜叶片 30 mg, 加石英砂和少量的

PVP 充分研磨, 采用上海生工生物工程有限公司植物 DNA 提取试剂盒方法提取样本 DNA。提取的 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 将条带明亮、整齐、无降解的样本适当稀释后保存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

### 2.2 ISSR-PCR 反应体系与扩增程序

首先用 10 个 DNA 样品对 100 个 ISSR 引物进行筛选, 最终选出 34 个扩增条带清晰的引物用于分析。总反应体系(20 μL)如下, 10×PCR Buffer 2.6 μL, Mg<sup>2+</sup> 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, Taq DNA 聚合酶 0.4 U, 引物 1.5 μmol·L<sup>-1</sup>, dNTPs 0.9 mmol·L<sup>-1</sup> 及 DNA 模板 0.8 μL。

扩增程序: 94 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃ 变性 45 s, (根据不同引物的退火温度)复性 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 40 个循环, 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存结束反应。

### 2.3 供试样品电泳检测

用筛选出的 9 条 ISSR 随机引物按其最佳退火温度对 60 个不同样本基因组 DNA 逐条进行 PCR 扩增。反应结束后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液为 5×TBE, 100 V 电压下电泳 90 min 左右, EB(10 mg·mL<sup>-1</sup>)染色 20 min, 在凝胶成像系统下检测并拍照保存。

### 2.4 数据统计与分析

ISSR 数据分析将 ISSR 扩增产物每个条带视为一个位点, 清晰、重复性好、分辨率高的条带用于分析, 按条带有或无分别赋值, 有带记为“1”, 无带记为“0”。按 Nei 等的方法<sup>[8]</sup>, 利用系统分析软件 Popgene 32(PHYLIP 3.5 版本)计算黄芩材料间的遗传相似系数和遗传距离, 按类平均数聚类法(UPGMA)进行聚类, 得到 UPGMA 系统树。

表 1 四倍体黄芩和二倍体黄芩 ISSR 分析试验材料信息

Tab. 1 Test material information of tetraploid and diploid *Scutellaria baicalensis*

| 编号 | 二倍体    | 编号 | 二倍体    | 编号 | 二倍体    | 编号 | 四倍体    | 编号 | 四倍体    | 编号 | 四倍体    |
|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|
| 1  | 2-1-1  | 11 | 2-2-1  | 21 | 2-3-1  | 31 | 4-1-1  | 41 | 4-2-1  | 51 | 4-3-1  |
| 2  | 2-1-2  | 12 | 2-2-2  | 22 | 2-3-2  | 32 | 4-1-2  | 42 | 4-2-2  | 52 | 4-3-2  |
| 3  | 2-1-3  | 13 | 2-2-3  | 23 | 2-3-3  | 33 | 4-1-3  | 43 | 4-2-3  | 53 | 4-3-3  |
| 4  | 2-1-4  | 14 | 2-2-4  | 24 | 2-3-4  | 34 | 4-1-4  | 44 | 4-2-4  | 54 | 4-3-4  |
| 5  | 2-1-5  | 15 | 2-2-5  | 25 | 2-3-5  | 35 | 4-1-5  | 45 | 4-2-5  | 55 | 4-3-5  |
| 6  | 2-1-6  | 16 | 2-2-6  | 26 | 2-3-6  | 36 | 4-1-6  | 46 | 4-2-6  | 56 | 4-3-6  |
| 7  | 2-1-7  | 17 | 2-2-7  | 27 | 2-3-7  | 37 | 4-1-7  | 47 | 4-2-7  | 57 | 4-3-7  |
| 8  | 2-1-8  | 18 | 2-2-8  | 28 | 2-3-8  | 38 | 4-1-8  | 48 | 4-2-8  | 58 | 4-3-8  |
| 9  | 2-1-9  | 19 | 2-2-9  | 29 | 2-3-9  | 39 | 4-1-9  | 49 | 4-2-9  | 59 | 4-3-9  |
| 10 | 2-1-10 | 20 | 2-2-10 | 30 | 2-3-10 | 40 | 4-1-10 | 50 | 4-2-10 | 60 | 4-3-10 |

3 结果与分析

3.1 ISSR 扩增多态性

在 100 条 ISSR 引物中共筛选出条带清晰、重复性好、阴性对照无带的 9 个随机引物作为正式扩增引物,这 9 个引物的碱基序列见表 2。对 30 份黄芩二倍体及 30 份四倍体株系引物进行扩增,大部分扩增片段大小在 200~2 000 bp。根据 Popgen 软件统计结果(表 3),所有材料共获得 70 个扩增位点,其中多态性位点 59 个;每个引物扩增位点为 5~10 个,平均 7.78 个,其中多态性位点 5~9 个,平均 6.55 个,多态性比率为 84.2%。这说明二倍体黄芩及其同源四倍体间存在较高的遗传差异,且 ISSR 标记能有效的揭示植物二倍体黄芩及四倍体黄芩间的多态性。

表 2 ISSR 引物 and 最佳退火温度

Tab. 2 ISSR primers and optimum annealing temperature

| 引物编号     | 引物序列 Sequence(5'-3')    | 退火温度/℃ |
|----------|-------------------------|--------|
| ISSR2002 | GTG TCG TGC GTG CGT GC  | 54     |
| UBC2811  | GAG AGA GAG AGA AC      | 54     |
| UBC2826  | ACA CAC ACA CAC ACA CC  | 52     |
| UBC2827  | ACA CAC ACA CAC ACA CG  | 52     |
| UBC2836  | AGA GAG AGA GAG AGA GYA | 52     |
| UBC2853  | TCT CTC TCT CTC TCT CRT | 54     |
| UBC2873  | GAC AGA CAG ACA GAC A   | 52     |
| UBC2874  | CCC TCC CTC CCT CCC T   | 54     |
| UBC2900  | ACT TCC CCA CAG GTT ACA | 54     |

表 3 ISSR 扩增引物和多态性

Tab. 3 ISSR amplification, primers and polymorphism

| 引物编号     | 总位点数 | 多态性位点数 | 多态性百分率/% |
|----------|------|--------|----------|
| ISSR2002 | 10   | 9      | 90       |
| UBC2811  | 5    | 5      | 100      |
| UBC2826  | 8    | 5      | 62.5     |
| UBC2827  | 7    | 5      | 71.4     |
| UBC2836  | 6    | 5      | 83.3     |
| UBC2853  | 9    | 8      | 88.9     |
| UBC2873  | 8    | 8      | 100      |
| UBC2874  | 8    | 6      | 75       |
| UBC2900  | 9    | 8      | 88.9     |
| 总计       | 70   | 59     |          |
| 平均       | 7.78 | 6.55   | 84.2     |

3.2 二倍体与同源四倍体黄芩株系的差异

不同的引物得到各自不同的基因组 DNA 条带,部分引物的 ISSR 扩增结果见图 1。由图 1 可知,每个引物扩增结果中二倍体和四倍体都有共

同的条带,且条带清晰,高低趋势基本一致。部分扩增结果(图 1B~E)显示二倍体黄芩与四倍体黄芩株系的 DNA 条带差异较大,总体来看,二倍体株系的条带普遍多于四倍体,如 UBC2900 引物扩增结果;也有部分引物扩增结果四倍体株系的条带多于二倍体(图 1D~E)。有的引物扩增结果显示二、四倍体间条带数目差异不大,但是存在多态性,如引物 UBC2874 引物扩增和 UBC2826 引物扩增结果。

另外,据 DNA 条带图显示,不同四倍体株系间普遍存在着差异,有的差异比较大,如 UBC2874 引物(图 1E)。不同二倍体株系间也存在着差异,如 UBC2826、UBC2827 扩增结果(图 1G~H)。

3.3 遗传距离与聚类分析

Popgen 软件统计结果表明,6 个不同小区(二倍体: S1、S2、S3; 四倍体: S4、S5、S6)中黄芩间遗传距离的变异范围是 0.086 9~0.242 9(表 4~5),其中二倍体第三个小区和四倍体第三个小区之间的遗传距离最大,为 0.242 9,表明两者之间的亲缘关系最远。二倍体第一个小区和二倍体第二个小区之间的遗传距离最近,为 0.086 9,说明二者之间亲缘关系最近。二倍体和四倍体黄芩材料间的遗传距离及相似系数结果见表 4。

表 4 材料间的遗传相似系数(上)和遗传距离(下)

Tab. 4 Genetic similarity coefficients (upper) and genetic distances between the materials (below)

| pop ID | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1      | ****   | 0.9167 | 0.9032 | 0.8616 | 0.8200 | 0.8093 |
| 2      | 0.0869 | ****   | 0.9078 | 0.8676 | 0.8367 | 0.8224 |
| 3      | 0.1019 | 0.0968 | ****   | 0.8803 | 0.8097 | 0.7843 |
| 4      | 0.1490 | 0.1420 | 0.1275 | ****   | 0.9118 | 0.8155 |
| 5      | 0.1985 | 0.1783 | 0.2111 | 0.0924 | ****   | 0.9000 |
| 6      | 0.2116 | 0.1955 | 0.2429 | 0.2039 | 0.1054 | ****   |

为了进一步表明各小区间的亲缘关系,利用 NTSYS 软件构建各小区 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图,通过聚类图可直接反映 6 个不同小区中黄芩亲缘关系,结果见图 2。聚类图结果表明,在遗传距离 0.83 处,二倍体 3 个小区聚为一类,四倍体 3 个小区聚为另一类;在遗传距离 0.855 处四倍体第一小区和四倍体第二小区聚在一起,四倍体第三小区聚为一类;在遗传距离 0.91 处,二倍体第一小区和二倍体第二小区聚在一起,二倍体第三小区归为另一类。

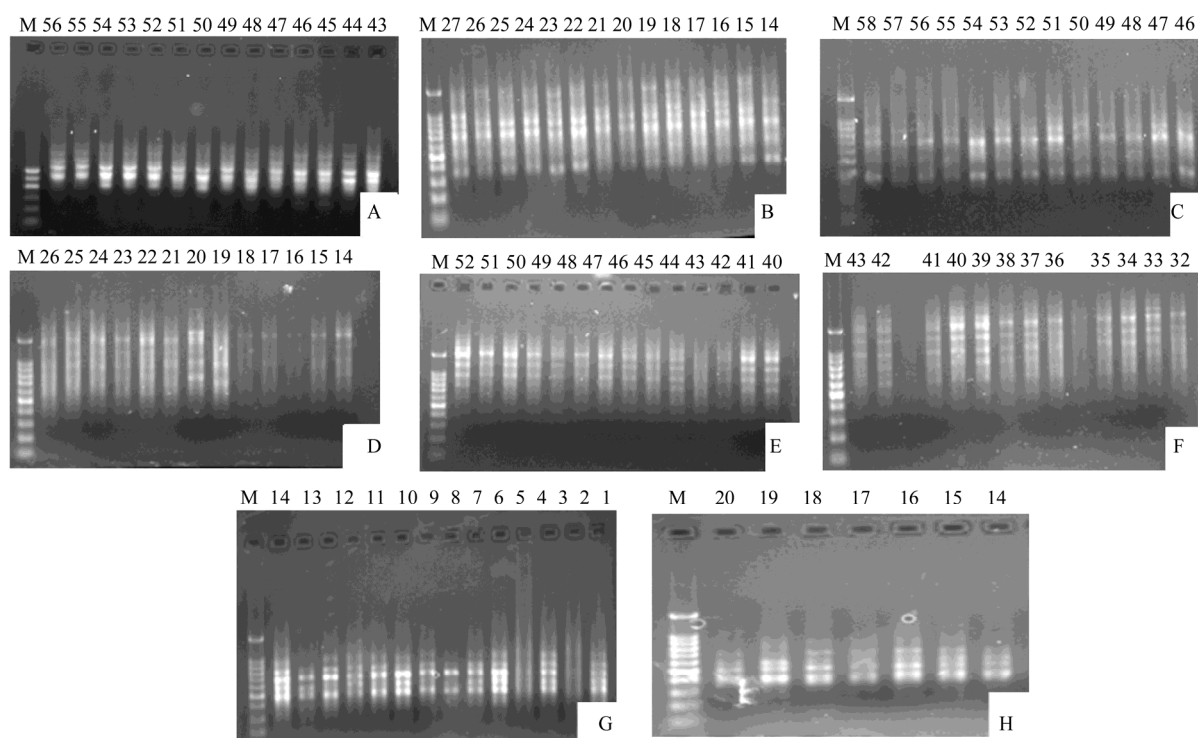


图1 不同引物对二倍体黄芩及四倍体黄芩的 ISSR 扩增结果

A-ISSR2002; B, C-UBC2900; D-F-UBC2874; G-UBC2826; H-UBC2827; 1~30-二倍体黄芩样品; 31~60-四倍体黄芩样品; M-marker。

Fig. 1 ISSR amplification of diploid and tetraploid *Scutellaria baicalensis* Georgi by different primers

A-ISSR2002; B, C-UBC2900; D-F-UBC2874; G-UBC2826; H-UBC2827; 1~30-diploid *Scutellaria baicalensis* Georgi; 31~60-tetraploid *Scutellaria baicalensis* Georgi.

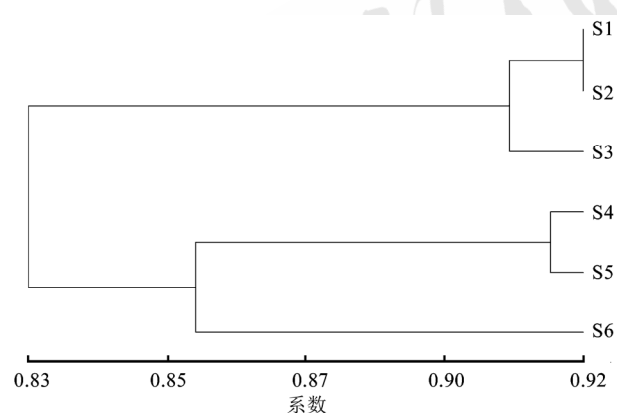


图2 基于 ISSR 标记的 6 个居群聚类分析

S1、S2、S3-二倍体第 1、2、3 小区; S4、S5、S6-四倍体第 1、2、3 小区。

Fig. 2 Cluster analysis of 6 populations based on ISSR markers

S1, S2, S3-Diploid 1, 2, 3 area; S4, S5, S6-Tetraploid 1, 2, 3 area.

#### 4 讨论

四倍体黄芩及二倍体黄芩的 ISSR 多态性分析表明, 尽管多个引物扩增结果显示四倍体与二倍体都有共同的条带, 但总体多态性百分率达 84.2%, 说明两者之间具有较大的遗传差异性。推

测可能是由于染色体诱变加倍时, 秋水仙碱的浓度、作用时间与部位, 以及外部环境条件的差异, 转座子活化, 甲基化模式的改变<sup>[9]</sup>, 造成四倍体在遗传结构上也发生多方向变异。另外部分结果显示四倍体株系的条带多于二倍体(图 1D~E UBC2874874 引物), 也有部分结果显示四倍体株系扩增条带少于或弱于二倍体, 如引物 UBC2900 扩增结果。推测可能是由于二倍体在加倍到四倍体的过程中, 某些染色体位点发生基因位点的重复、突变、缺失等; 聚类结果显示, ISSR 分子标记能将黄芩二倍体与四倍体分开, 为品系的鉴定提供一定依据。

黄芩以根入药, 因此根部农艺性状和根部有效成分的含量成为衡量多倍体优良品种的重要标准。前期研究表明<sup>[10-11]</sup>, 四倍体黄芩新品系 D20 由于染色体的加倍, 在农艺性状上显示出多倍体植株所特有的巨大性特征, 且其植株生活力增强, 在产量及有效成分含量等方面均优于二倍体, 有望进一步开发利用。

本研究利用 ISSR 标记技术, 初步揭示了黄芩

四倍体及二倍体的遗传差异,未来可利用分子育种技术并结合四倍体黄芩新品系 D20 的优势进一步阐明四倍体黄芩 D20 的生理生化及遗传基础,为四倍体黄芩新品系 D20 大田栽培提供理论依据。但四倍体黄芩是否可以完全代替二倍体黄芩入药,还有待于进一步药理、毒理和临床实验的深入研究。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 344-345.
- [2] WEN M M, LI G S, ZHANG L J, et al. Analysis and evaluation on genetic diversity of *Scutellaria baicalensis* G. by ISSR markers [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2012, 32(01): 32-37.
- [3] CHEN H G, ZHANG Y H, WANG H Z, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Scutellaria baicalensis* Georgi D20 [J]. J Shanxi Agric Sci(山西农业科学), 2012, 40(1): 11-12.
- [4] CHEN B J, GAO S L, BIAN Y Y, et al. The inducing of autotetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi by tissue culture [J]. J Plant Resources Envir(植物资源与环境学报), 2000, 9(1): 10-12.
- [5] WANG X P, YONG H J, DU J C, et al. Tetraploid induction and issr analysis in *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Northern Horticulture(北方园艺), 2010, (17): 158-160.
- [6] DUAN Y Z. Analysis of genetic variation between diploids and their homologous tetraploids of *Lsatis indigotica* fort. by ISSR [J]. Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin(西北植物学报), 2012, 32(8): 1534-1538.
- [7] WANG H J, HAN P P, LI Y T, et al. MSAP and ISSR analysis of diploid and autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* [J]. J Nanjing Agricult Univ(南京农业大学学报), 2016, 39(02): 220-227.
- [8] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonuclease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [9] LIU Y, DU T, CHAI J W, et al. Comparative study on shapes, properties and microscopic characteristics between diploid Radix Scutellariae and tetraploid Radix Scutellariae D20 [J]. J Gansu Univ Chin Med(甘肃中医药大学学报), 2017, 34(2): 65-69.
- [10] LIU Y, CHAI J W, ZHANG Y Y, et al. Comparative study on chemical constituents between tetraploid and diploid *Scutellaria baicalensis* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40(2): 284-289.
- [11] 于辉, 高赛男, 任亚超, 等. HPLC 法测定四倍体黄芩中黄芩苷和汉黄芩苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(1): 15-16.

收稿日期: 2017-07-10

(本文责编: 蔡珊珊)