

· 基础研究 ·

昆仑雪菊表型性状及分子标记的遗传多样性研究[△]樊丛照¹, 郎乾坤², 朱军¹, 王果平¹, 宋海龙¹, 李晓瑾^{1*}

1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所/国家中医药管理局 新疆中药民族药资源重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830002;

2. 阿克苏市人民医院, 新疆 阿克苏 843000

[摘要] **目的:** 从表型性状和分子学角度研究双色金鸡菊种质资源的多样性。**方法:** 对双色金鸡菊 19 个采集地 120 份供试样品的 10 个表型性状进行统计, 并用 14 条简单重复序列区间(ISSR)引物进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 电泳检测后统计条带; 使用 SPSS 21.0 等软件分析表型数据, PopGene 32 分析条带统计结果。**结果:** 表型性状中株高的遗传多样性信息指数最高, 其次是花冠大小和花色差异、茎秆粗细; 聚类结果可将 19 个采集地样品聚为两大类, 其中引种高海拔山区的双色金鸡菊有聚在一起的趋势。ISSR-PCR 扩增结果显示双色金鸡菊在物种水平上有较高的遗传多样性, 不同产地有明显的遗传分化; 聚类结果将 19 个采集地的双色金鸡菊分为 5 大类, 皮山县等高海拔地区样品在遗传物质上显示出较强的地域性。**结论:** 昆仑雪菊种质资源存在地域性的遗传分化, 表型性状和 ISSR 分子标记可对昆仑雪菊的种质资源进行评价。

[关键词] 昆仑雪菊; 双色金鸡菊; 表型性状; ISSR; 遗传多样性

[中图分类号] R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1367-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190422003

Diversity Study of Kunlun Snow Chrysanthemum Base on Phenotypic Traits and Molecular Marker

FAN Cong-zhao¹, LANG Qian-kun², ZHU Jun¹, WANG Guo-ping¹, SONG Hai-long¹, LI Xiao-jin^{1*}

1. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, State Administration of traditional Chinese medicine

Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Resources, Urumqi 830002, China;

2. People's Hospital of Akesu city, Akesu 843000, China

[Abstract] **Objective:** Study the diversity of *Coreopsis tinctoria* by phenotypic traits and molecular perspective. **Methods:** Ten phenotypic traits of 120 samples which collected from 19 area were counted, and 14 ISSR primers were used to amplify the samples. The phenotypic traits and electrophoretic bands were counted artificially, SPSS 21.0 and PopGene 32 were used to analyse the statistical data. **Results:** The phenotypic traits diversity index that plant height was the highest traits, followed by corolla size, color difference and stem thickness. 19 samples were cluster into two categories by SPSS 21.0, and almost the samples from high-altitude gathering together. ISSR-PCR amplification results showed that *Coreopsis tinctoria* had higher genetic diversity at the species level, and there were obvious genetic differentiation from different areas. The clustering results divided the sample of 19 collections into five categories, and samples at high altitudes such as Pishan city showed strong regionality in genetic level. **Conclusion:** The germplasm resources of *Coreopsis tinctoria* have differentiated regionally, phenotypic traits and ISSR molecular markers can be used to evaluate the germplasm resources.

[Keywords] Kunlun snow chrysanthemum; *Coreopsis tinctoria*; phenotypic traits; ISSR; genetic diversity

21 世纪初, 在和田援疆的干部发现, 当地盛行饮用一种产自当地高海拔称之为“古丽恰尔”的花茶, 气味浓郁, 神清气爽。援疆干部们在给亲朋好友介绍时, 根据产地和外观取名为“昆仑雪菊”。相传其分布于克里昂乡 3000 m 左右的高山草甸, 极为

稀少, 市场多为采摘该野生种子栽培的产品。然而经植物分类学专家鉴定, “昆仑雪菊”系菊科双色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt., 原产于北美, 为我国引种观赏花卉品种。但研究表明无论是植物形态还是化学组成, 源于和田地区的本品与其他地区的皆有所不同^[1]。

[△] [基金项目] 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21); 中央本级重大增减支项目(2060302)

* [通信作者] 李晓瑾, 研究员, 研究方向: 中药资源, Tel: (0991)2665614, E-mail: xjlxj@126.com

表型性状的统计分析是种质资源研究最基本的方法^[2],具有数据收集快、经济等优点^[3];分子标记能够直接精确地反映出遗传物质的差异,并表现出更高的多态性^[4],其中简单重复序列区间(inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)具有操作简单、快速高效、遗传多态性高、重复性好等特点^[5],在药材产地评价和遗传多样性研究等方面已有广泛应用^[6-8]。因此,本研究拟使用表型性状统计及 ISSR 分子标记等方法,研究不同区域雪菊种质资源表型性状与遗传物质的多样性,揭示不同产地间的差异,为正确定位“昆仑雪菊”提供科学依据,对发掘当地特色产品、服务于精准扶贫,具有十分重要的现实意义和科学价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 收集不同产区的 19 份雪菊种质资源,2016 年 5 月种植于新疆昌吉职业技术学校试验田,试验条件一致。2016 年 8 月分别采集 120 株的新鲜叶片,保存于 -80℃ 冰箱备用,样品信息见表 1。

表 1 昆仑雪菊种质来源与样品信息

编号	产地	样本编号	收集人
1	未知 1 号	1~2	殷刚
2	未知 2 号	3~6	殷刚
3	新疆特克斯县	710	杨明华
4	新疆民丰县 1 号	11	朱军
5	新疆乌鲁木齐市	12~15	朱军
6	新疆皮山县 1 号	16~21	朱军
7	新疆皮山县 2 号	72~28	朱军
8	新疆布尔津县	29~37	王果平
9	新疆温泉县	38~44	朱军
10	新疆皮山县 3 号	45~55	朱军
11	新疆阿拉尔市	56~74	郎乾坤
12	新疆皮山县 4 号	75~87	朱军
13	新疆民丰县 2 号	88~91	朱军
14	新疆吐鲁番市	92~94	李江荣
15	甘肃兰州市	95~100	李江荣
16	新疆和田县	101~110	李江荣
17	新疆于田县	111~112	李江荣
18	新疆皮山县 5 号	113~117	李江荣
19	新疆达坂城	118~120	李江荣

1.1.2 试剂 异丙醇(分析纯);乙醇(分析纯);Tris 平衡酚(北京索莱宝科技有限公司);RNase A 酶(天根生化科技北京有限公司,批号:RT405-02);

2 × Taq PCR MasterMIX (博迈德生物);ISSR 引物(参照 British Columbia 大学公布的引物序列,由上海生工合成)。

1.1.3 仪器设备 Anker TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器有限公司);070-851PCR 型扩增仪(An Analytik Jena company);恒温金属水浴锅(天根生化科技北京有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 表型性状统计 测定每株供试品的株高(ZG)、径粗(JC)、冠幅(GF)、分枝数(FZS)、第一分支的高度(FZG)、叶长/叶宽(YCK)、花冠直径(HG)、花蕊直径(HR)、花色(HS 花瓣上的红色区域)、花瓣数(HBS)10 个表型性状。

1.2.2 DNA 提取及检测 采用改良 CTAB 区室法^[9],提取样品 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带大小及质量。

1.2.3 PCR 扩增及检测 ISSR-PCR 反应体系 25 μL,包括 2 × Taq PCR MasterMIX 12.5 μL, H₂O 9 μL,引物 2.5 μL, DNA 模板 1 μL。反应条依次为预变性 3 min;变性 30 s,退火 30 s,延伸 30 s,循环 35 次;延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.3 数据处理

1.3.1 表型数据处理 采用分级的方法对表型数据进行处理^[10];利用 Shannon-Wiener 信息指数计算遗传多样性信息指数(H),其计算公式为 $H = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$ 。其中, P_i 表示一个性状中存在 S 种类型,第 i 个类型的品种数占总品种数的比例;采用欧氏距离对供试材料进行基于组内联接法的系统聚类;运用 Excel 软件和 SPSS20.0 对原始数据进行统计分析。

1.3.2 ISSR-PCR 扩增结果处理 对 ISSR 引物扩增条带进行赋值:清晰条带记作“1”,没有条带记作“0”;用 POPGENE 处理 0/1 矩阵图,计算多态位点百分率(PPB)、有效等位基因数(Ne)、Nei's 遗传多样性指数(H)、Shannon's 信息指数(I)、群体总基因多样性(Ht)、群体内的基因多样性(Hs)、群体间的遗传分化系数(G_{ST})、基因流(Nm);按非加权配对法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 表型性状的极差分级及多样性分析结果

120 份样品的表型性状结果如表 2 所示,遗传多样性信息指数(H)大小依次为:株高>花冠=花色>

表 2 昆仑雪菊在表型性状各级别的分布量及其遗传多样性信息指数

部位	分布量										遗传多样性信息指数(H)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ZG	8	17	14	14	19	12	12	8	2	4	2.16
JC	19	19	28	16	17	1	2	3	1	4	1.86
GF	21	24	33	17	10	2	2	1	0	1	1.67
FZS	1	15	33	0	34	19	0	5	2	1	1.57
FZG	55	29	17	3	5	0	0	0	0	1	1.27
YCK	28	90	97	70	35	16	8	3	0	1	1.76
HG	4	18	46	48	84	69	56	17	4	2	1.94
HR	126	198	8	1	2	0	0	1	0	2	1.07
HS	5	21	43	77	68	60	28	27	5	1	1.94
HBS	1	214	0	71	4	26	0	4	0	6	1.09

茎粗>叶长/叶宽>冠幅>分枝数>第一分支的高度>花瓣数>花蕊直径。表型性状中株高的变异度和丰富度最大,为2.16;最小的是花蕊直径,为1.07。

2.2 表型性状的聚类分析

雪菊 19 个采集地的 10 个平均表型性状聚类后被分为 2 类(如图 1)。第一类包括温泉县、兰州市、吐鲁番市、布尔津县、于田县、达坂城、阿拉尔、和田县,其中温泉县和兰州市的平均表型性状最近,其次是布尔津县和于田县。第二类包括民丰县 1~2 号、皮山县的 1~5 号、未知 1~2 号、特克斯、乌鲁木齐市;其中民丰县 1 号和 2 号的平均表型性状最近;其次是未知 2 号,乌鲁木齐市、皮山县 1 号和 5 号,未知 1 号和特克斯县。

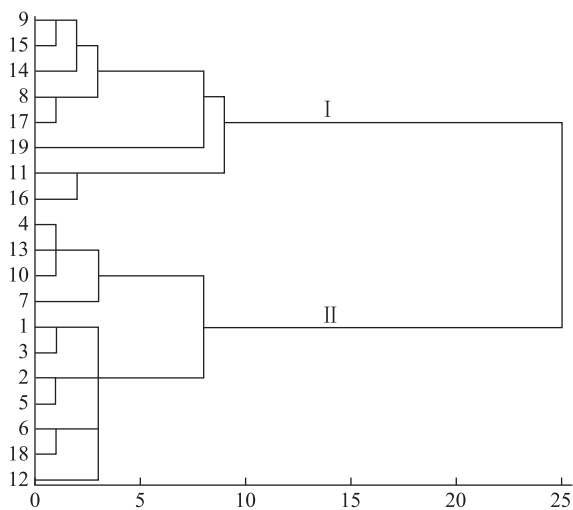


图 1 双色金鸡菊 19 个采集地表型性状聚类图

2.3 ISSR 遗传多样性统计结果

14 条引物共扩增出 263 个位点,分子量在

100~5000 bp,不同引物扩增的多态位点数从 13 到 24 个不等,平均每个引物检测到 18.78 个位点,如图 2,其中多态位点 255 个,占 96.96%。总的 Ht 为 0.292 2,种群内的 Hs 为 0.149 8,种群间的 Dst 为 0.142 4。物种水平上,PPB 为 96.96%、Ne 为 1.464 4,H 为 0.281 1,I 为 0.432 1;居群水平上,各种群的 PPB 差异较大,平均值为 42.13%,平均有效等位基因为 1.259 0,平均 H 和 I 分别为 0.149 8、0.223 1。见表 3~4。

表 3 ISSR 反应体系中所使用引物的信息及扩增结果

引物	序列	退火温度/℃	扩增带数	多态性带数	PPB/%
820	(GT) ₈ C	54.6	13	13	100.00
827	(AC) ₈ G	54.6	18	18	100.00
834	(AG) ₈ YT	53.9	17	17	100.00
835	(AG) ₈ YC	56.2	22	20	90.91
836	(AG) ₈ YA	53.9	19	18	94.74
841	(GA) ₈ YC	56.2	17	17	100.00
848	(CA) ₈ RG	56.2	20	20	100.00
849	(GT) ₈ YA	53.9	15	15	100.00
850	(GT) ₈ YC	56.2	18	17	94.44
855	(AC) ₈ YT	53.9	20	19	95.00
856	(AC) ₈ YA	53.9	19	18	94.74
857	(AC) ₈ YG	56.2	24	24	100.00
873	(GACA) ₄	51.6	22	20	90.91
880	(GGAGA) ₃	53.6	19	19	100.00

表 4 昆仑雪菊的遗传多样性参数

采集地	样本数	位点数	多态位点数	多态位点比率/%	Shannon's 信息指数(I)	Nei's 基因多样性指数(H)
1	2	263	61	23.19	0.140 3	0.096 1
2	4	263	86	32.70	0.183 9	0.124 5
3	4	263	131	49.81	0.284 9	0.193 9
4	1	263	0	0.00	0.000 0	0.000 0
5	4	263	55	20.91	0.118 3	0.080 3
6	6	263	141	53.61	0.294 1	0.198 9
7	7	263	120	45.63	0.258 1	0.176 6
8	9	263	195	74.14	0.385 6	0.257 7
9	7	263	157	59.70	0.320 7	0.215 4
10	11	263	138	52.47	0.257 7	0.171 4
11	19	263	186	70.72	0.327 9	0.215 2
12	13	263	157	59.70	0.283 7	0.186 8
13	4	263	131	49.81	0.264 5	0.175 6
14	3	263	63	23.95	0.140 6	0.096 1
15	6	263	117	44.49	0.231 4	0.154 1
16	10	263	154	58.56	0.271 9	0.176 7
17	2	263	36	13.69	0.082 8	0.056 7
18	5	263	83	31.56	0.174 7	0.118 0
19	3	263	94	35.74	0.218 6	0.151 5
平均		263	110	42.13	0.223 1	0.149 8
总计	120	263	252	96.96	0.432 1	0.281 1

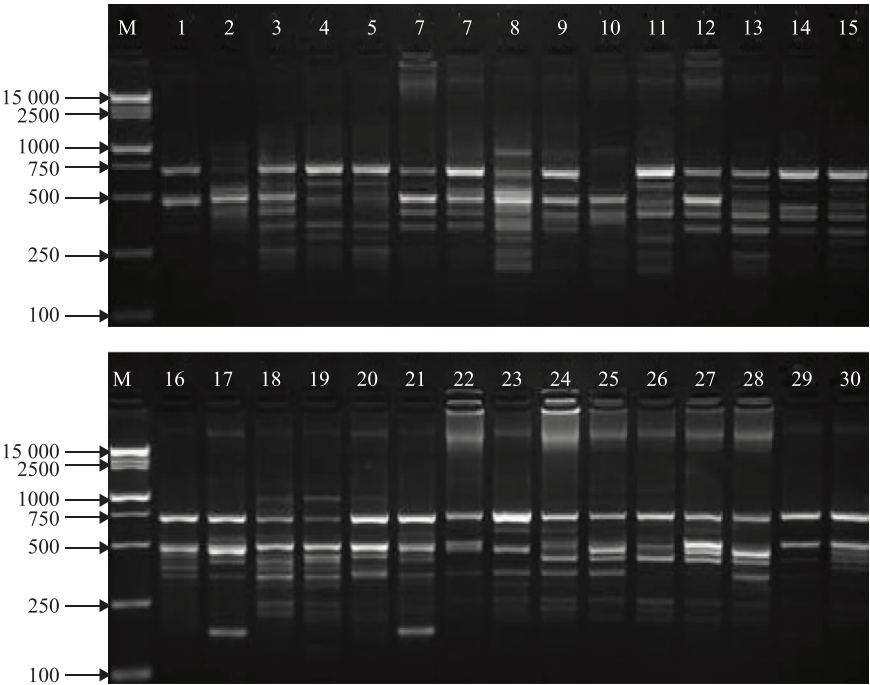


图 2 引物 841 对昆仑雪菊供试样品 1~30 的扩增图谱

2.4 群体的遗传分化

POPGENE 计算得到种群间的基因 G_{ST} 为 0.487 4, 即 48.74% 的遗传变异来源于种群间, 51.26% 的遗传变异来源于种群内; 双色金鸡菊种群间 N_m 为 0.525 9 < 1, 表明基因交流处于低等水平; 19 个采集地之间的 Nei's 遗传一致度在 0.660 9 ~ 0.948 8,

传变异来源于种群内; 双色金鸡菊种群间 N_m 为 0.525 9 < 1, 表明基因交流处于低等水平; 19 个采集地之间的 Nei's 遗传一致度在 0.660 9 ~ 0.948 8,

平均值0.824 0;遗传距离分布在0.052 6~0.414 1,平均值0.196 2。其中皮山县5号和达坂城两采集地之间的遗传一致度最高(0.948 8),遗传距离最小(0.052 6)。

2.5 不同产地的聚类分析

19个雪菊采集地UPGMA聚类结果(如图3)在第15步被聚为5类:未知1号和特克斯县被聚为第一类;皮山县1~3号被聚为第二类;布尔津县、阿拉尔市、皮山县4~5号、民丰县、温泉县、和田县、达坂城、兰州市、于田被聚为第三类;未知2号、乌鲁木齐市、民丰县被聚为第四类,吐鲁番市被单独聚为第五类。

3 讨论

为了消除环境因素的干扰,本研究将来源于不同产地的双色金鸡菊种质资源在同一产地种植,并保证生长条件一致性。数量性状统计结果表明,不同种质资源的双色金鸡菊外观形态呈现显著差异,除了株高、径粗、冠幅等数量性状存在显著差异外,花色(花瓣上的红色区域面积)也存在显著的差异。总体来看,来源于平原地区的种质资源和来源于高海拔地区的种质资源分为两大类群,这表明,环境因素可能在一定程度上影响了双色金鸡菊遗传物质的分化。

遗传多样性研究结果表明,双色金鸡菊遗传多

样性指数为0.281 1,大于同科药用菊花(PPB=81.87%, $H=0.219\ 1$)^[11],有较高的遗传多样性,决定了其较强的环境适应能力,因此双色金鸡菊能够在新疆各种生态环境下引种成功。但从Nm指数来看,双色金鸡菊种群间基因交流处于较低水平,这也进一步证明了双色金鸡菊在不同环境长期引种栽培过程中遗传物质发生了区域性的遗传分化,实际表现在不同产区表型性状、气味、浸出液色度、有效成分^[12-13]等方面的差异,因此导致市场上也出现了质量和外观参差不齐的雪菊产品。

在全球尺度上植物的遗传物质与纬度、气候因素之间存在显著的非线性关系^[14]。在和田昆仑山地区生长的双色金鸡菊与环境相适宜,产生了适合本地区环境的遗传分化。ISSR遗传多样性分析结果表明,生长在皮山县干旱、高寒、高海拔地区的昆仑雪菊在遗传物质上显示出较强的地域性和道地性,因此,昆仑山区产的昆仑雪菊无论在品质还是价格上都长期保持着巨大的优势。虽然环境会对雪菊的品质造成一定的影响,但近些年由于盲目的人工栽培导致原始的种质与其他地区种质发生基因交流,也是造成昆仑雪菊种质混乱、品质良莠不齐的一个重要因素,因此保护昆仑雪菊原产地的种质资源对保持昆仑雪菊的市场竞争力具有重要的意义。

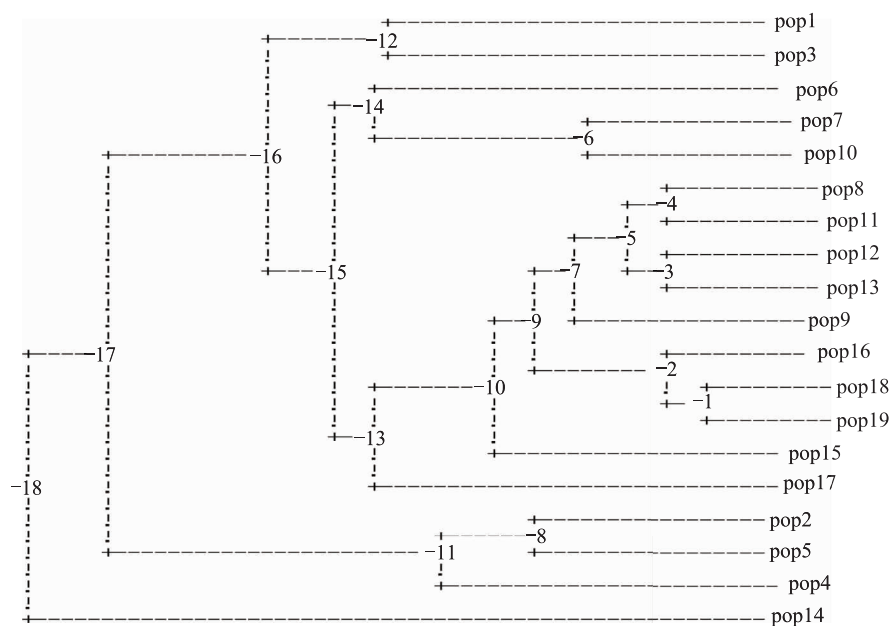


图3 基于ISSR的昆仑雪菊19个采集地的遗传聚类图

(下转第1391页)

- 31(4):80-83.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第15卷[M]. 北京:科学出版社,1978:92.
- [4] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志[M]. 北京:科学出版社,1976:354.
- [5] 黄贤校,高文远,满淑丽,等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展[J]. 中草药,2009,40(3):483-489.
- [6] 王跃虎,牛红梅,张兆云,等. 重楼属植物的药用价值及化学物质基础[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):833-839.
- [7] 程虎印,程江雪,王艳,等. 陕产宽叶重楼的生药学研究[J]. 中国现代中药,2019,21(1):1480-1485.
- [8] 程虎印,徐进,颜永刚,等. 陕产重楼属药用植物的研究进展[J]. 陕西中医药大学学报,2017,40(1):107-111.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:134-137.
- [10] 钟方晓,任海华,李岩. 多糖含量测定方法比较[J]. 时珍国医国药,2007,18(8):1916-1917.
- [11] 杨骁,张振秋. 重楼中总皂苷的含量测定[J]. 中华中医药学刊,2007,25(11):2420-2422.
- [12] GUPTA S D, JATOTHU B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis[J]. Plant Biotechnol Rep, 2013, 7(3):211-220.
- [13] 魏灵玲,杨其长,刘水丽. LED在植物工厂中的研究现状与应用前景[J]. 中国农学通报,2007,23(11):408-411.
- [14] DARKO E, HEYDARIZADEH P, SCHOEFS B, et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism[J]. Phil Trans R Soc B Biol Sci, 2014, 369(1640):20130243.
- [15] 彭亮,赵停,杨冰月,等. 不同光质光强对远志生长和相关酶活性及成分的影响[J]. 中草药,2018,49(21):5004-5009.
- [16] 高亭亭,斯金平,朱玉球,等. 光质与种质对铁皮石斛种苗生长和有效成分的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):198-201.
- [17] 梁宗锁,李倩,徐文晖. 不同光质对丹参生长及有效成分积累和相关酶活性的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2055-2060.
- [18] 黄希,梁社往,蔡虎铭,等. 不同LED橙蓝光质对比对滇重楼叶片光合特性和叶绿素荧光参数的影响[J]. 中国农学通报,2016,32(22):98-103.
- [19] 闻永慧,孟英,李慧敏,等. LED不同光质对白及组培苗生长及可溶性糖含量的影响[J]. 北方园艺,2014,38(15):58-62.
- [20] 张勤涛,梁社往,曹嘉芮,等. LED不同光质对滇重楼生长、光合特性、皂苷含量及产量的影响[J]. 照明工程学报,2018,29(4):45-49.

(收稿日期: 2019-01-31 编辑: 王笑辉)

(上接第1371页)

参考文献

- [1] 郭玉婷,景玉霞,吴燕妮,等. 新疆和田地区不同产地昆仑雪菊的质量评价[J]. 新疆医科大学学报,2013,36(10):1459-1462.
- [2] 孙亚东,梁燕,吴江敏,等. 番茄种质资源的遗传多样性和聚类分析[J]. 西北农业学报,2009,18(5):297-301.
- [3] 刘新龙,马丽,蔡青,等. 云南甘蔗品种表型性状的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(6):703-708.
- [4] GLASZMANN J C, KILIAN B, UPADHYAYA H D, et al. Accessing genetic diversity for crop improvement[J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13(2):167-173.
- [5] 周延清. DNA分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:15-17.
- [6] XU L, LU Y, QIAN Y, et al. Biogeographical Variation and Population Genetic Structure of *Sporisorium scitamineum* in Mainland China: Insights from ISSR and SP-SRAP Markers[J/OL]. Scientific World J, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/296020>.
- [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):887-890.
- [8] SZENEJKO M, SMIETANA P, STĘPIEŃ E. Genetic diversity of *Poa pratensis* L. depending on geographical origin and compared with genetic markers[J]. PeerJ, 2016, 4(9):1-22.
- [9] 郎乾坤,樊丛照,朱军,等. 维吾尔药茶昆仑雪菊ISSR分子标记体系的建立[J]. 生物资源, 2017, 39(1):36-41.
- [10] 范李萍,吴鹏昊,王莉萍,等. 基于遗传和表型特征的海岛棉遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(2):197-208.
- [11] 邵清松,郭巧生,张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. 中草药,2009,40(12):1971-1975.
- [12] 陈刚,帕丽达,朱军,等. 立地条件对昆仑雪菊品质的影响[J]. 中国现代中药,2013,15(12):1060-1063.
- [13] 孙自增,毕肯·阿不都克力木,张彦丽,等. 不同产地雪菊化学成分含量测定及模式识别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):174-178.
- [14] 解梦,于晶,郭水良. 植物核DNA含量在全球尺度上的纬度变异式样及其气候适应意义——以菊科植物为例[J]. 生态学报,2018,38(10):3453-3461.

(收稿日期: 2019-04-22 编辑: 王丽英)