

杨正久,代建忠,梁大敏,等.洛龙党参与其他川党参遗传多样性的 ISSR 分析[J].江苏农业科学,2018,46(6):43-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.011

洛龙党参与其他川党参遗传多样性的 ISSR 分析

杨正久¹,代建忠¹,梁大敏¹,毛朝坤¹,董红梅¹,马增凤²

(1.遵义医药高等专科学校医学技术系,贵州遵义 563006; 2.广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005)

摘要:利用简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术对遵义洛龙党参与其他川党参的遗传多样性进行分析,为遵义种植党参品种的鉴定、筛选利用及遗传改良提供方法和理论依据。根据优化的 ISSR-PCR 反应体系,筛选出 10 条引物对 12 个党参品种的 DNA 进行扩增,并应用 NTsys 2.10e 软件,对所得数据进行分析处理。得到了不同品种的遗传相似系数和遗传距离,并绘制出非加权组平均法(UPGMA)聚类图和主坐标分析的二维、三维散点图。结果表明,洛龙党参与其他川党参具有丰富的基因资源和遗传多样性,遗传差异明显,且遗传距离与地理位置表现出明显相关性。从基因层面上阐明了洛龙党参在口感、成分含量及药效评价指标等诸多方面品质优异的可能性。

关键词:洛龙党参;川党参;遗传多样性;ISSR 分子标记

中图分类号: S567.5+30.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0043-03

党参为桔梗科党参属植物,川党参产于四川、贵州、湖南、湖北、陕西等省,历史悠久,品种较多,已大量人工栽种,不同品种间的性状与药用成分含量存在差异。洛龙党参又名洛党,产于贵州省道真仡佬族苗族自治县东北部的洛龙山区而得名,是川党参的生态变种^[1],以其肉质鲜嫩、药用价值高而深受外界青睐。党参主要成分有多糖、党参苷、甾醇类、生物碱、内酯类、豆素类等,具有益气生津、补脾养胃的功效,用于脾肺虚弱、气短心悸、虚喘咳嗽、内热消渴等病症^[2]。余兰等研究表明,洛龙党参的多糖含量达 25.6%~27.75%,比其他川党参高 10.97%^[3]。

目前分子标记用于党参种质遗传多样性的研究较少,利用简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术对道真洛龙党参种质资源遗传多样性方面的研究还尚未见报道。本研究利用 ISSR 技术对道真阳溪和坝羊的洛龙党参与四川、重庆等地其他川党参的种质遗传多样性进行研究,为贵州省遵义市种植党参品种的鉴定、筛选利用及遗传改良提供方法和理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料及来源

本研究共采用 12 个党参品种(表 1),分别来自贵州省遵义道真县、重庆、湖北及四川种植党参种子萌发的嫩叶。选取成熟种子,脱粒去杂,催芽后,置于放有滤纸的培养皿上于 25℃ 萌发,发芽 3~5 cm 高时取幼苗嫩叶,置于 -40℃ 冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:GelDoc XR⁺ 凝胶成像系统(BIO-RAD),Eppendorf Mastercycler[®] 普通 PCR 仪,Smart SpecTM3000 型分

表 1 试验材料及来源

种植品种编号	拉丁名	来源地
1	<i>Codonopsis pilosula</i>	道真阳溪
2	<i>Codonopsis pilosula</i>	道真阳溪
3	<i>Codonopsis pilosula</i>	道真坝羊
4	<i>Codonopsis pilosula</i>	重庆奉节
5	<i>Codonopsis pilosula</i>	重庆巫山
6	<i>Codonopsis pilosula</i>	湖北竹溪
7	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川德阳
8	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川宜宾
9	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川广安
10	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川雅安
11	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川达州
12	<i>Codonopsis pilosula</i>	四川乐山

光光度计(BIO-RAD),VE-180 型电泳槽(上海天能科技有限公司),EPS-300 型电泳仪(上海天能科技有限公司),TGL-16G 台式离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。主要试剂:丙烯酰胺、双丙烯酰胺、硝酸银、37% 甲醛、四乙基乙二胺(TEMED)、ISSR 引物(北京赛百盛基因技术有限公司)。

1.3 党参基因组 DNA 的提取

取党参试验材料,采用经改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取 DNA^[4-5],用琼脂糖凝胶电泳测定其纯度,用分光光度计测定其浓度,将提取的 DNA 稀释到终浓度 40 ng/μL,用作 PCR 扩增的模板。

1.4 ISSR 引物的筛选和 PCR 扩增

选用提取的党参基因组 DNA 为模板,进行 ISSR 引物筛选和 PCR 反应扩增。PCR 反应体系为 20 μL:模板 DNA 1 μL(约 30~53 ng),ISSR 引物 1 μL(约 5 pmol),PCR mix 18 μL。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ min,56℃ 45 s,72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 5 min,4℃ 保存。取扩增产物 5 μL 在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,以 0.5×TBE 为缓冲液,稳压 150 V,电泳至溴酚蓝距凝胶边缘 2~3 cm 处结束。采用银染法进行染色。

收稿日期:2017-07-14

基金项目:贵州省遵义市科技局重点项目(编号:遵义市科合社字[2013]16号)。

作者简介:杨正久(1975—),男,湖南泸溪人,硕士,副教授,主要从事生物化学的教学和研究。E-mail:yang282@163.com。

1.5 数据处理与分析

ISSR-PCR 扩增产物经电泳检测后,得到电泳图谱,用 Quantity One 6. 0 分析软件结合人工读带,按条带的有无(有记为 1,没有则记为 0)记录电泳条带,同时将出现频率超过 99%的条带视为共有带,出现频率低于 1%的条带,即被视为没有条带而不计入内。将读出的数据录入 Excel,建立数据库矩阵。

应用 NTsys 2. 10e 软件,利用 ISSR 分子标记数据计算党参品种间的遗传相似性系数,采用非加权组平均法(UPGMA)构建党参品种间的遗传关系聚类图;将 SM 遗传相似性矩阵进行 Dcenter 数据转化,求其特征量和特征向量,生成主坐标二维、三维散点图。

2 结果与分析

2.1 ISSR 引物的筛选及扩增结果

以来自道真阳溪 1 号和 2 号党参基因组 DNA 作为模板,从 100 条引物中筛选出 10 条引物。利用这 10 条引物能在 12 个党参试验材料中扩增出清晰的条带,且多态性、稳定性和重复性较好(表 2)。

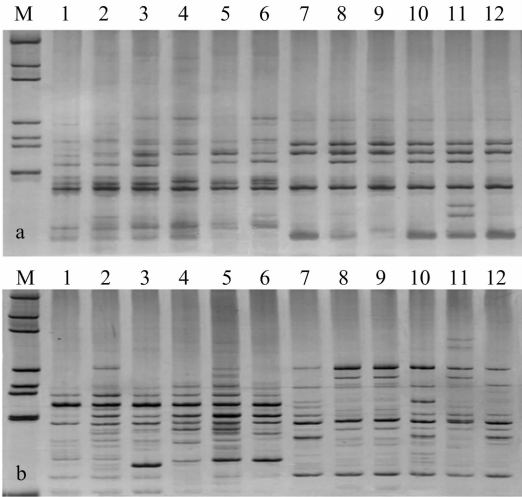
表 2 引物筛选及扩增结果

引物	扩增条带数 (条)	多态性条带数 (条)	多态性比例 (%)
UBC807	16	14	87.50
UBC809	11	9	81.82
UBC811	19	16	84.21
UBC816	15	13	86.67
UBC825	14	13	92.86
UBC826	14	11	78.57
UBC834	13	12	92.31
UBC835	8	6	75.00
UBC836	14	10	71.43
UBC881	12	10	83.33
合计	136	114	83.82

2.2 ISSR-PCR 图谱及多态性分析

本研究从 100 条引物中筛选出扩增条带清晰、重复性好、多态性丰富的 10 条引物,对 12 份供试党参样品进行 ISSR-PCR 扩增,共扩增出 136 个可区分的 DNA 条带,平均每条引

物扩增出 13.6 条条带(表 2)。在扩增出的 136 条 DNA 条带中,多态性条带有 114 条,多态性条带占比为 83.82%,平均每每条引物扩增 11.4 条多态性条带。其中引物 UBC807 和 UBC811 扩增的条带数及多态性条带数较为丰富(图 1),DNA 总条带数分别为 16 条和 19 条,多态性条带数分别为 14 条和 16 条。这表明川党参种质具有较为丰富的遗传多样性。



a—引物 UBC807; b—引物 UBC811
图1 引物 UBC807 和引物 UBC811 扩增结果

2.3 遗传相似性分析

利用 ISSR 分子标记数据计算党参品种间的遗传相似性系数(表 3)。ISSR-PCR 扩增结果表明,12 个党参品种之间的遗传相似性系数均在 0.5 以上,平均为 0.683 6,处于 0.518~0.908 之间。其中道真阳溪洛龙党参品种(1)和四川乐山党参品种(12)之间的遗传相似性系数最小,为 0.518,二者之间亲缘关系最远;四川乐山(12)和四川雅安(10)之间的遗传相似性系数最大,表明二者之间的亲缘关系最近。道真县的 3 个洛龙党参品种(1、2、3)之间的遗传相似性系数均较大,在 0.775 以上,但道真洛龙党参品种与四川地区的 6 个品种(7~12)之间的遗传相似性系数较小,在 0.50~0.65 之间,表明遵义道真洛龙党参品种与四川地区党参品种的亲缘关系较远。

表 3 遗传相似性分析结果

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000 0											
2	0.821 1	1.000 0										
3	0.775 2	0.779 8	1.000 0									
4	0.706 4	0.738 5	0.747 7	1.000 0								
5	0.674 3	0.752 3	0.724 8	0.766 1	1.000 0							
6	0.651 3	0.665 1	0.674 3	0.706 4	0.692 7	1.000 0						
7	0.550 5	0.591 7	0.600 9	0.614 7	0.582 6	0.605 5	1.000 0					
8	0.555 0	0.614 7	0.623 9	0.600 9	0.605 5	0.564 2	0.857 8	1.000 0				
9	0.568 8	0.591 7	0.628 4	0.605 5	0.619 3	0.587 2	0.862 4	0.848 6	1.000 0			
10	0.555 0	0.623 9	0.633 0	0.610 1	0.633 0	0.573 4	0.876 1	0.880 7	0.857 8	1.000 0		
11	0.559 6	0.582 6	0.600 9	0.559 6	0.582 6	0.568 8	0.853 2	0.867 0	0.844 0	0.876 1	1.000 0	
12	0.518 3	0.605 5	0.623 9	0.582 6	0.614 7	0.555 0	0.848 6	0.853 2	0.867 0	0.908 3	0.848 6	1.000 0

2.4 聚类分析

基于遗传图距,应用 NTsys 2. 10e 软件,对来自道真洛

龙、四川、重庆及湖北的 12 个党参品种进行 UPGMA 聚类分析。如图 2 所示,12 个党参品种在 0.591 处分为 A、B 2 支,

来自遵义道真、重庆及湖北的 6 个党参品种(1~6)聚为 A 支,来自四川省的 6 个党参品种(7~12)聚为 B 支,而 A 支中来自道真洛龙和重庆奉节与巫山的党参品种又聚为 A_1 支, A_1 支又分为 A_{11} (道真 3 个品种)和 A_{12} (重庆 2 个品种)2 支,来自湖北的党参品种(6)单独成 1 支(A_2 支),来自四川的 6 个党参品种分为 B_1 和 B_2 2 支,但遗传差距很小。结果表明,本研究中的 12 个党参种植品种与地理分布有着明显的相关性,来自同一地区的品种间遗传差异较小,而不同地区的品种之间的遗传差异最大。

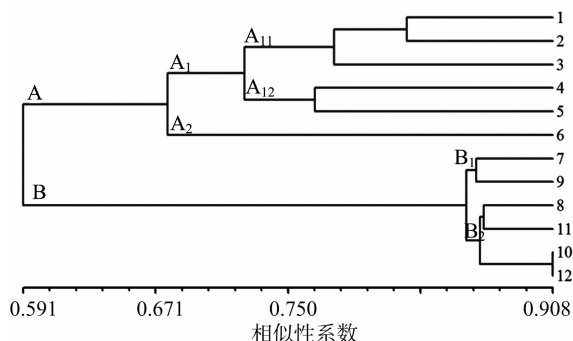


图2 党参种质 ISSR 聚类分析树状图

2.5 主坐标分析

主坐标分析以党参品种间的遗传相似性系数矩阵为基础,不同品种在主坐标图中的位置能反映它们之间的亲缘关系。品种间位置越接近,表明它们的遗传相似性越大,亲缘关系越近,反之,则表明遗传差异越大,亲缘关系越远^[6]。产生的主坐标二维、三维散点图分别见图 3、图 4。不难看出,主坐标分析结果与聚类分析结果一致。来自道真洛龙的 3 个党参品种(1~3)遗传相似性较高,聚集在二维图的右上角,来自重庆及湖北的 3 个党参品种分布在二维图的右下方;来自四川的 6 个党参品种(7~12)遗传距离较远,分布在二维图的左侧,由于四川的 6 个党参品种间的遗传差异很小,因此密集地聚集在一起。从三维图上更能看出品种间的分类很明显。

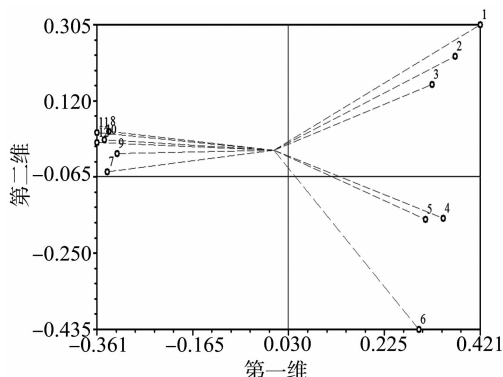


图3 基于 ISSR 标记数据分析主坐标二维散点图

3 结论与讨论

DNA 分子标记技术发展至今已有几十种,ISSR 分子标记技术由于具有成本低、可靠性及稳定性高,试验操作简单、快速、高效等优点,被广泛应用到各类研究中,是理想的分子标记技术^[7-8]。利用 ISSR 分子标记技术研究党参遗传多样性

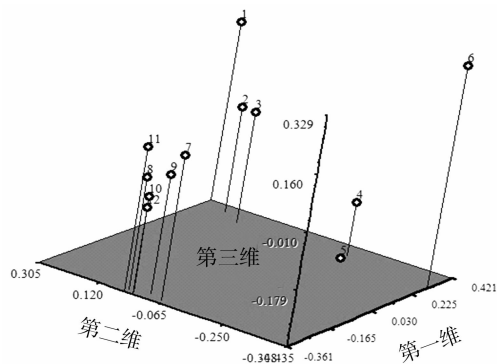


图4 基于 ISSR 标记数据分析主坐标三维散点图

的报道不多,陈大霞等用 21 条 ISSR 引物对 18 份川党参材料扩增出 223 个 DNA 条带,其中有 166 个多态性条带,平均多态率为 74.44%^[9];郭宏波从 100 条 ISSR 中筛选出 13 条引物,对来自山西和甘肃 2 省的 150 份党参材料进行分析,扩增出 127 个清晰的 DNA 条带,其中多态性条带 122 个,平均多态率为 95.77%^[10]。以上研究表明,ISSR 分子标记技术具有良好的稳定性和准确性,适合用于种质资源遗传多样性的分析。

本研究选用洛龙党参和四川、重庆、湖南各产地种植党参品种,以党参的幼苗为材料,对 CTAB 法进行优化改良,提取党参基因组 DNA。通过优化 PCR 反应体系,从 100 条不列颠哥伦比亚大学(UBC)公布的 ISSR 引物中筛选,以不同产地种植党参的基因组 DNA 为模板,用筛选的 ISSR 引物进行分子标记 PCR 扩增,用聚丙烯酰胺电泳对产物进行检测,有利于扩增产物的分辨。本次筛选出的 10 条 ISSR 引物对 12 个党参品种共扩增出 136 个清晰的 DNA 条带,多态性条带 114 条,平均多态性比例为 83.82%,最高为 92.86%,最低为 71.43%。其中引物 UBC811 扩增出的 DNA 条带总数和多态性 DNA 条带数最多,分别为 19 条和 16 条;而引物 UBC835 扩增的 DNA 条带数最少,只有 8 条,多态性 DNA 条带数 6 条。ISSR 标记 DNA 图谱表明,洛龙党参与其他川党参具有丰富的基因资源。基因型是遗传和生态 2 个因素长期复杂的相互作用的产物,土壤和地理环境对种内变异起重要作用^[11]。党参大面积的种植通常采用种子和种根 2 种繁殖方式^[9],零星种植也常采用野生种及半野生种的驯化栽培,因此党参种源复杂,加上道真、四川、重庆及湖北等地不同土壤和地理环境以及气候与光照的影响,造成了党参品种具有丰富的遗传多样性。

遗传相似性分析与基于遗传距离的聚类分析及主坐标分析显示,12 个党参品种遗传距离与地理位置分布有着明显的相关性。四川省的 6 个党参品种遗传距离较远,形成 1 支,且品种间的遗传距离很近,相似性高;道真洛龙党参与重庆党参品种遗传相似性最高,与湖北党参品种间的遗传相似性次之,与四川省的党参品种遗传相似性最低。张建清等利用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术分析甘肃栽培党参的遗传多样性时,也发现党参栽培居群的遗传距离与地理分布呈现一定的相关性^[12],这可能与地域间基因的流动受限有关,也与大面积党参种植采用种根繁殖有关,影响了党参种质的遗

杭柏林,徐 军,胡建和. 鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):46-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.012

鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学分析

杭柏林,徐 军,胡建和

(河南科技学院动物科技学院,河南新乡 453003)

摘要:为了解鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的基本信息,根据鸡 LEAP-2 的氨基酸序列,通过软件对鸡 LEAP-2 的生物信息学进行分析。结果表明,鸡 LEAP-2 由 20 种氨基酸构成,等电点为 9.86,分子量为 8 835.65 u,为不稳定的疏水蛋白,定位于细胞核内,有 1 个跨膜区和 1 个信号肽,有 2 个糖基化位点和 8 个磷酸化位点,二级结构由 α 螺旋、延伸链、 β 折叠和无规则卷曲组成,三级结构和功能结构域类似于人 LEAP-2,存在多个抗原表位,根据系统进化树推测,鸡 LEAP-2 与日本鹌鹑 LEAP-2 进化关系最近。研究结果为鸡抗菌肽 LEAP-2 的深入研究提供了信息基础。

关键词:鸡;抗菌肽;Ⅱ型肝脏表达抗菌肽(LEAP-2);生物信息学;氨基酸序列

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)06-0046-05

抗菌肽(antimicrobial peptides,简称 AMPs)是生物机体内具有抗细菌、抗病毒、抗肿瘤等多种生物学活性的多肽,是机体先天免疫系统的重要组成部分^[1-2]。抗菌肽具有低毒、高效、抗菌谱广、低耐药等特点,成为抗生素替代物研究中的佼佼者^[3-4]。Krause 等从人血液中分离到肝脏表达的抗菌肽 LEAP-1、2,其中Ⅱ型肝脏表达抗菌肽(liver-expressed antimicrobial peptide 2,简称 LEAP-2)有较强的抗微生物活性,但肽的序列、二级结构和表达等方面与其他已知肽类有差

异^[5]。从鸡体内分离到的 LEAP-2 由 76 个氨基酸构成,具有抗微生物(如沙门氏菌)的活性^[6]。但鸡 LEAP-2(cLEAP-2)的许多生物信息学内容还不是很清楚。因此,本研究基于 cLEAP-2 的氨基酸序列利用在线生物软件和程序进行生物信息学分析,为深入探讨其抗菌作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的氨基酸来自网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>,登录号为 NP_001001606,其序列为 MHCLKIMAFLLFFSLLSQVYCASLHQPPQLRLKRMT PFWRGVSLRPGVASCARDNSECITMLCRKNRCLRTASE。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽理化性质分析 利用 www.expasy.org/tools 网站中的 ProtParam 工具对抗菌肽 cLEAP-2 进行理化性质参数的分析。

1.2.2 抗菌肽的二级结构预测 利用 <https://npsa-prabi>.

[J]. 中国医院药杂志,2014,10(34):782-786.

[7]Nagaoka T O,Gl I Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997,94(5):597-602.

[8]Gilbert J E,Levis R V,Wilkinson M J. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999,98(6/7):1125-1131.

[9]陈大霞,彭 锐,李隆云,等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析川党参的遗传多样性[J]. 中国中药杂志,2009,3(34):255-259.

[10]郭宏波. 野生与栽培党参遗传多样性及其保存和保护策略研究[D]. 上海:复旦大学,2007.

[11]王晓明,谢碧霞,李俊彬,等. 金银花 ISSR 分子标记及遗传多样性分析[J]. 中南林业科技大学学报,2008,28(6):14-18.

[12]张建清,苏 雪,吴 琼,等. 药用植物党参的 RAPD 分析[J]. 中药材,2006,29(5):417-420.

收稿日期:2016-10-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31672559);河南省高校科技创新团队支持计划(编号:15IRTSTHN);河南科技学院高层次人才启动项目(编号:2014020);河南科技学院 2015 年度大学生“百农英才”创新项目(编号:BNYC2015-2-09)。

作者简介:杭柏林(1978—),男,江苏海安人,博士,讲师,主要从事动物病原与新兽药研究。E-mail:yzhl001@126.com。

通信作者:胡建和,博士,教授,主要从事动物病原与新兽药研究。E-mail:xxjianhe@126.com。

传多样性。因此,建议在今后的党参育种过程中,考虑开展不同优良品种中种群间的杂交育种,以获得更广泛的遗传基础,培育出优良的新品种。

参考文献:

- [1]陈 璽,韩 丰,杨建敏,等. 洛龙党参贮藏保鲜技术研究[J]. 贵州农业科学,2009,37(9):216-217.
- [2]龚其海,赵 万,余 兰,等. 两种党参多糖对小鼠免疫功能影响的比较[J]. 遵义医学院学报,2012,4(34):268-270.
- [3]余 兰,陈 华,娄方明,等. 洛龙党参的多糖含量测定[J]. 贵州农业科学,2010,38(7):190-191.
- [4]周东新,祁建民,吴为人,等. 黄麻 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立[J]. 福建农业大学学报,2001(3):334-339.
- [5]白风虎,李德芳,陈安国,等. 改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究[J]. 中国麻业科学,2007,29(3):158-161.
- [6]何 峰,唐 灿,王子雯,等. 巴中栀子遗传多样性的 ISSR 分析