

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.016.html>

◇ 药学研究 ◇

## 酢浆草遗传多样性的 ISSR 分析

吴林菁<sup>1,2</sup> 冯 华<sup>3</sup> 杜 强<sup>4</sup> 吴红梅<sup>2</sup> 徐 锋<sup>2</sup> 杨 焯<sup>2</sup> 王祥培<sup>2</sup> 沈祥春<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨酢浆草种质资源遗传多样性,为酢浆草遗传差异的评定及优良种质资源的筛选提供分子水平的参考依据。方法 采用简单序列重复区间(ISSR)分子标记技术对酢浆草 18 个居群 36 个样本及红花酢浆草 2 个居群 4 个样本进行遗传多样性分析。结果 从 59 条 ISSR 引物中筛选出 10 条引物用于 PCR 扩增,共扩增出 89 条 DNA 条带,其中多态性条带 78 条,占 87.64%,平均每个引物扩增条带的数目为 8.9 条。利用 POPGENE1.32 和 NTSYS-pc 软件分析得出 40 个样本的平均有效等位基因数为 1.3888,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.3493,平均 Shannon 信息指数为 0.2252;UPGMA 聚类结果,在遗传相似性系数 0.6558 处把供试的 40 个样本分为 4 大类。结论 本研究选用的酢浆草样本遗传多样性比较丰富,酢浆草与红花酢浆草的 ISSR 遗传多样性差异较明显。

**关键词** 酢浆草;ISSR;遗传多样性

中图分类号 R 282.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0850-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.016

酢浆草为酢浆草科植物酢浆草(*Oxalis corniculata* L.)的新鲜或干燥全草,为多年生宿根草本植

物,在我国主要分布于华北、华中、华南、贵州、四川和云南等地,在世界各地亦有分布,是贵州省少数民族用药品种之一<sup>[1-2]</sup>。酢浆草是一种极好的地被和盆栽植物,全草均可入药,其性寒、味酸,归肝、肺、膀胱经,具有清热利湿、凉血消肿、解毒散瘀功效,主要用于治疗湿热泄泻、淋证、赤白带下、咽喉肿痛、湿疹、麻疹、跌扑损伤、烫伤、蚊虫叮咬等症<sup>[3]</sup>。

由于酢浆草生态环境差异较大,又为多年生植物,且不同的采收期都会影响酢浆草的质量,目前市面上还出现将其变种如红花酢浆草(*Oxalis corymbosa* DC.)、紫叶酢浆草(*Oxalis violacea* L.)等冒充酢浆草来混用的现象,使酢浆草的品质出现差异。目前酢浆草的研究主要集中在显微鉴别<sup>[4-5]</sup>、化学成分<sup>[6-8]</sup>、药理作用<sup>[9-12]</sup>及临床应用方面<sup>[12-13]</sup>,在遗传多样性方面的研究尚未见报道。该研究首次采用简单序列重复区间(inter simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术研究酢浆草种质资源的遗传多样性,为酢浆草遗传差异的评定及优良种质资源的筛选提供分子水平的参考依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 仪器** Beckman DU-640 核酸蛋白分析仪、DY-Cp-31D 型电泳仪(北京市六一仪器厂);Mastercycles 型 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);Britain GGM/D2 凝胶成像系统(英国 SYNGENE 公司)。

**1.2 试剂与药物** 植物基因 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技公司);100 bp DNA Ladder Marker、琼脂糖、Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程有限公司);引物设计参照加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)公布的序列,由上海生物工程技术服务有限公司合成。

酢浆草药材主要是采自西南地区 18 个酢浆草居群共 36 个样本,这 18 个居群分布于中国的 4 个省和直辖市,包括贵州、四川、云南、北京等地,见表 1。经贵阳中医学院王祥培教授鉴定均为酢浆草科植物酢浆草(*Oxalis corniculata* L.)。另外在这 18 个居群中选取云南石林、贵阳中医学院两个居群采集酢

2017-01-20 接收

基金项目:贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(编号:黔科合中药字[2010]5028号);遵义市创新人才团队培养项目(编号:遵市科合[2016]7号);贵州省科技合作项目(编号:黔科合 LH 字[2016]7368);贵州省普通高等学校创新团队建设项目(编号:黔教合人才团队字[2014]31);贵州省科技创新人才团队建设项目(编号:黔科合人才团队[2015]4025号);贵州省高层次创新型人才培养项目(编号:黔科合人才[2015]4029号);贵州省大学生创新创业训练计划项目(编号:201610660031)

作者单位:<sup>1</sup>贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价重点实验室,贵阳 550025

<sup>2</sup>贵阳中医学院生药实验室,贵阳 550002

<sup>3</sup>遵义市食品药品检验所中药室,遵义 563000

<sup>4</sup>贵州省水产研究所营养与病害科,贵阳 550025

作者简介:吴林菁,女,硕士,讲师;

王祥培,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wxp0123@126.com;

沈祥春,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:shenxiangchun@126.com

表1 酢浆草药材的来源

编号	居群代码(品种)	采收时间	采样数	采集地点	经度(E)	纬度(N)	海拔(m)
1	LiuZhi( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.9	2	贵州六枝县火车站	105°45′	26°30′	1 344.0
2	JinSha( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.13	2	贵州金沙县源村乡	106°60′	27°43′	843.1
3	QingZhen( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.16	3	贵州清镇市人民广场	106°46′	26°56′	1 254.8
4	XingYi( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.22	1	贵州兴义市万峰林	104°88′	25°08′	1 282.8
5	DuYun( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.11	2	贵州都匀市西山公园	107°51′	26°25′	780.2
6	LongLi( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.11	2	贵州龙里县火车站	106°97′	26°45′	1 081.4
7	AnShun( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.9	1	贵州安顺职校	105°93′	26°48′	1 379.0
8	WuDang( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.18	3	贵州贵阳市乌当东风镇	106°82′	26°64′	984.1
9	KaiLi( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.8	2	贵州凯里市客车站	108°41′	26°70′	803.2
10	JianHe( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.7	2	贵州剑河县源江村	108°44′	26°72′	487.5
11	ZunYi( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.4	2	贵州遵义市凤凰山	106°92′	27°70′	953.5
12	YunNan( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.9.25	3	云南石林风景区	103°32′	24°83′	1 773.0
13	GuiYang( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.18	2	贵阳中医学院	106°82′	26°63′	998.2
14	ChengDU( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.8	2	四川成都市温江区	103°80′	30°69′	538.0
15	TaiJiang( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.7	1	贵州台江县莱东街	108°44′	26°73′	654.7
16	YinJiang( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.9.29	2	贵州印江天堂镇	108.49′	27°43′	600.2
17	WangMo( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.10.19	2	贵州望谟县城区花园	104°53′	25°15′	1 593.2
18	BeiJin( <i>Oxalis corniculata</i> L.)	2011.11.9	2	北京市朝阳区	116°47′	40°00′	40.9
19	YunNanH( <i>Oxalis corymbosa</i> DC.)	2011.9.25	2	云南石林风景区	103°31′	24°87′	1 769.0
20	GuiYangH( <i>Oxalis corymbosa</i> DC.)	2011.10.18	2	贵阳中医学院	106°85′	26°61′	994.5

浆的混淆品红花酢浆草(*Oxalis corymbosa* DC.) 4个样本,以期更好的分析酢浆草的遗传多样性。取酢浆草新鲜叶片,用硅胶干燥并保存与塑封袋中,带回实验室,置于-70℃低温冰箱保存,用于DNA提取。

**1.3 总DNA提取** 采用北京天根生化科技有限公司提供的植物基因组DNA提取试剂盒提取酢浆草基因组DNA。经核酸蛋白分析仪测定提取的DNA浓度和纯度后,置于-20℃冰箱备用。

**1.4 ISSR反应条件建立及引物筛选** 通过对基因组DNA浓度、Taq DNA聚合酶、引物、Mg<sup>2+</sup>、dNTP、退火温度等主要因素的调整、优化,确定ISSR-PCR扩增反应总体积为25 μl,内含:1.5 U Taq DNA聚合酶、10×PCR buffer 2.5 μl、1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、1.0 μl 模板DNA、0.5 mmol/L dNTPs、0.5 mmol/L 引物, ddH<sub>2</sub>O 补齐。

实验选用加拿大哥伦比亚大学公布的第9套ISSR引物序列(共100条),由上海生工生物工程技术有限公司合成,从中挑选59条引物。筛选引物时,随机挑选5个模板DNA,在25 μl ISSR-PCR反应体系中进行扩增。

**1.5 ISSR扩增及产物检测** 扩增反应在PCR扩增仪上进行,扩增程序为:95℃预变性5 min;之后进行30次循环:95℃变性30 s,最适退火温度下退火30 s(退火温度随引物而定,见表2),72℃延伸1 min,循环结束后72℃延伸5 min。

**扩增产物检测:**以100 bp Ladder-DNA Marker为分子量标记,在0.5×TBE缓冲液中,于1.5%琼脂糖(含0.1% EB)凝胶,90 V电压下,电泳50 min,用Britain GGM/D2凝胶成像系统照相保存。

**1.6 统计学处理** 对各个居群ISSR-PCR产物的电泳图谱进行判读,每个电泳图谱中同一扩增位点上有条带记作“1”,无条带记作“0”,得到由“1”和“0”组成的二元式数据矩阵。利用POPGENE1.32软件计算各遗传多样性参数,即多态位点百分率(*P*)、Shannon信息指数(*I*)、有效等位基因数目(*Ne*)、*Nei's*基因多样性指数(*He*)和遗传相似系数(*S*)。运用NTSYS-pc 2.0软件,基于*Nei's*遗传距离对居群进行非加权配对算数平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)进行聚类分析。

## 2 结果

**2.1 引物筛选** 从59个引物中筛选出10条扩增条带清晰、多态性高且重复性好的引物(表2),用于全部20个居群40个样本的遗传多样性分析。

**2.2 ISSR扩增结果** 筛选的10条引物共扩增出清晰可重复的条带89条,其中多态条带78条。每条引物扩增的条带数介于8~10条,平均为8.9条,平均多态位点百分率占87.64%。图1为引物80402G67对酢浆草20个居群的40个样本总DNA进行ISSR扩增的琼脂糖电泳图谱。

**2.3 遗传多样性分析** 根据统计分析显示 酢浆草 40 个样本的平均有效等位基因数  $N_e$  为 1.388 8 (1.013 5 ~ 1.779 4); 平均  $Nei's$  基因多样性指数为 0.349 3 (变幅为 0.075 3 ~ 0.510 2), 平均 Shannon 信息指数为 0.225 2 (0.105 9 ~ 0.415 4) 表明 40 个

酢浆草样本个体间存在丰富的遗传多样性。

**2.4 聚类分析** 以酢浆草 40 个样本 ISSR 扩增的 87 个位点的谱带数据为原始矩阵, 运用 NTSYS-pc 2.0 软件计算样本间的  $Nei's$  遗传相似系数, 并进行 UPGMA 聚类分析 (图 2)。由计算结果得出, 40 个

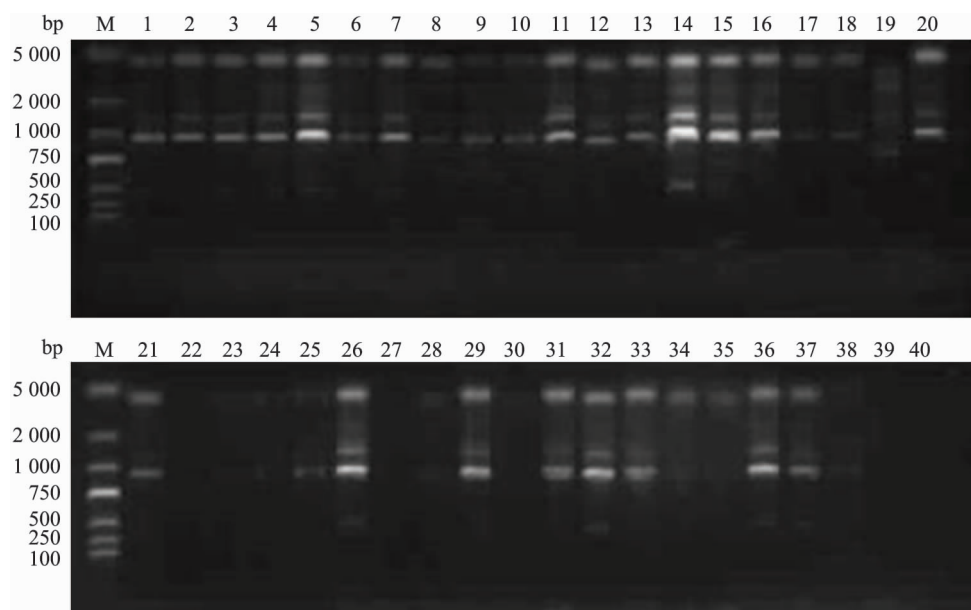


图 1 引物 80402G67 对酢浆草 20 个居群 40 个样本的扩增结果

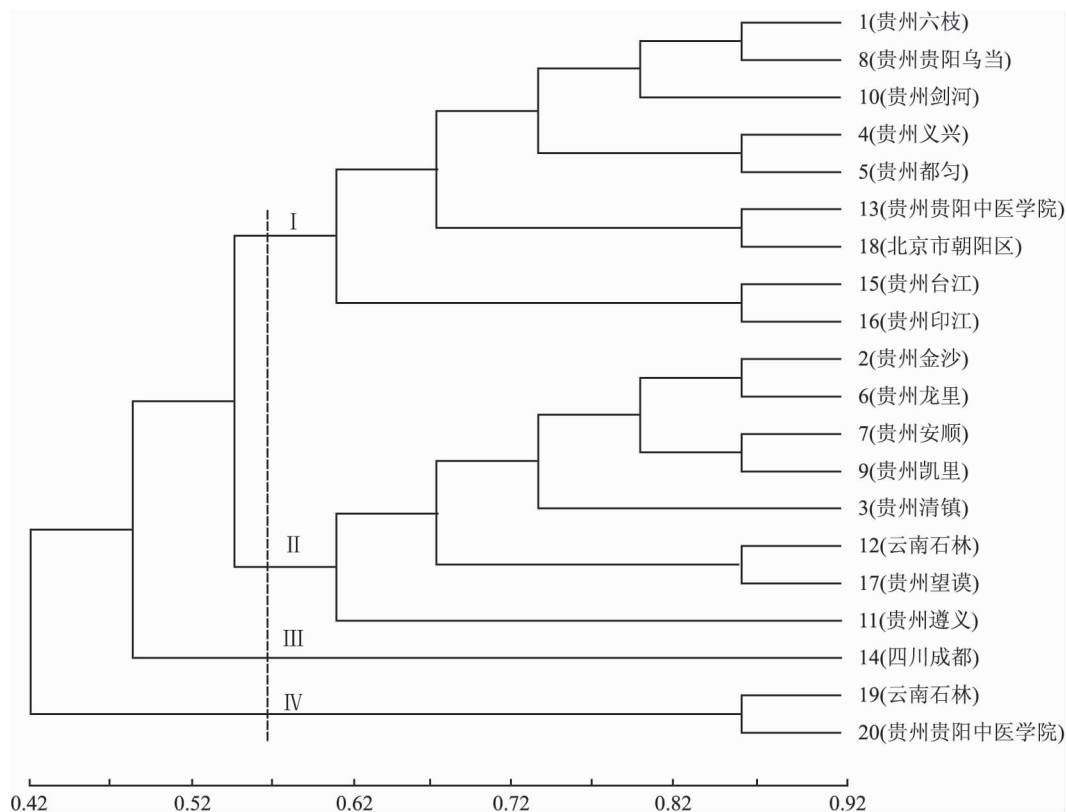


图 2 酢浆草基于  $Nei's$  遗传距离的 UPGMA 聚类图

表2 筛选的10条引物序列

引物代号	序列(5'→3')	退火温度(℃)
80402G04	(AG) <sub>8</sub> T	55
80402G07	(GA) <sub>8</sub> T	55
80402G08	(GA) <sub>8</sub> C	55
80402G09	(GA) <sub>8</sub> A	55
80402G12	(CT) <sub>8</sub> G	55
80402G46	G(GA) <sub>2</sub> G(GA) <sub>2</sub> G(GA) <sub>2</sub>	56
80402G63	(GA) <sub>8</sub> YT	55
80402G64	(GA) <sub>8</sub> YC	55
80402G66	(CT) <sub>8</sub> RA	48
80402G67	(CT) <sub>8</sub> RC	56

酢浆草样本中,样本17与样本22的遗传相似系数最大,为0.837;样本1与样本40的遗传相似系数最小,为0.425。以相似系数0.656为阈值可以把40个样本聚为4类:第Ⅰ类由贵州六枝、贵州贵阳乌当等9个产地的样本组成;第Ⅱ类由贵州金沙、贵州龙里等8个产地的样本组成;第Ⅲ类为四川成都的样本;第Ⅳ类包括云南石林、贵州贵阳医学院的红花酢浆草样本。

### 3 讨论

生物所携带遗传信息的总和就是该生物的遗传多样性,它是一种长期进化的产物。一个群体的遗传多样性越高,表明其适应环境的能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新的环境,而物种或群体的进化潜力和适应环境的能力取决于遗传多样性的大小<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,采自贵州、云南、四川、北京等地20个群体的40个个体在物种水平上的平均多态位点百分率高达87.64%、平均Shannon信息指数为0.225 2、平均Nei's基因多样性指数为0.349 3。以上结果表明本实验选用的酢浆草样本遗传多样性水平较高,其原因可能是与所有样本均呈野生状态,且其所处的植物群落结构差异较大;其次,本研究所采集的40个样本分布范围较广,海拔跨度为40.9~1 773.0 m,生态环境的差异较大;再次,大量研究<sup>[15]</sup>证实,ISSR标记结合了RAPD标记和SSR标记的优点,在同一水平上能比RAPD检测出更多的多态性。本研究通过分子生物学方法研究酢浆草的遗传多样性,可为选育酢浆草优良种质资源提供依据。

酢浆草有红花酢浆草、紫叶酢浆草和蔓生酢浆草等多个变种,其特点是长势整齐、植株矮小、花期

很长,对其周围生长的杂草有一定抑制作用。本研究选取的云南石林、贵州贵阳医学院两个居群的红花酢浆草与酢浆草进行ISSR遗传多样性分析,结果表明2个居群的红花酢浆草与其余18个居群的酢浆草遗传系数较小,通过聚类分析把2个居群的红花酢浆草单独归为一类,说明酢浆草与红花酢浆草的ISSR遗传多样性差异较明显,为今后酢浆草药材的临床用药指导和研究开发奠定了一定的科学依据。

### 参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴:2册[M]. 北京:科学出版社,1980:581-2.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵州:贵州科技出版社,2003:366.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第4册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:717-9.
- [4] 余汉华,王勇,肖英华,等. 酢浆草的生药鉴定[J]. 中国民族民间医药杂志,2005,(3):178-9.
- [5] 吴林菁,聂明华,冯华,等. 酢浆草显微鉴别的专属性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):133-7.
- [6] 冯华,邓丽娟,吴林菁,等. 酢浆草高效液相色谱指纹图谱的鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(10):2414-6.
- [7] 王海生,王隶书,范艳君,等. 酢浆草提取物中总黄酮含量的分光光度法测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):578-9.
- [8] 刘受先,吴欢,邓志清,等. RP-HPLC测定不同产地酢浆草中刺槐素-6-C-β-D-葡萄糖苷含量[J]. 江西中医学院学报,2011,23(1):55-6.
- [9] 崔珺,刘星星,李月婷,等. 贵州苗族药酢浆草不同溶剂提取物的药效比较及HPLC测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):53-6.
- [10] 崔珺,杨雅欣,郝林,等. 贵州苗药酢浆草水提物的抗炎镇痛作用[J]. 贵阳医学院学报,2016,41(4):427-9.
- [11] 陈应康,罗国忠,田培燕,等. 水药酢浆草对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护性研究[J]. 中国现代医学杂志,2015,25(36):12-5.
- [12] Abhilash P A, Nisha P, Prathapan A, et al. Cardioprotective effects of aqueous extract of *Oxalis corniculata* in experimental myocardial infarction[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2011, 63(6): 535-40.
- [13] 张萌,王俊丽. 酢浆草研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2012(8):150-5.
- [14] 中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994:142-57.
- [15] 朱岩芳,祝水金,李永平,等. ISSR分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子,2010,29(2):55-9.

## ISSR analysis on genetic diversity of *Oxalis*

Wu Linjing<sup>1,2</sup>, Feng Hua<sup>3</sup>, Du Qiang<sup>4</sup>, et al

(<sup>1</sup>The High Educational Key Laboratory of Natural Medicinal Pharmacology and Drugability Guizhou

Medical University, Guiyang 550025; <sup>2</sup>Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;

<sup>3</sup>Zunyi Institute for Drug Control, Zunyi 563000; <sup>4</sup>GuiZhou Institute of Aquaculture Science, Guiyang 550025)

**Abstract Objective** To study the genetic diversity of germplasm resources of *Oxalis corniculata*, and to provide molecular basis for reference of *Oxalis corniculata* by assessing genetic differentiation and selecting of excellent germplasm resources. **Methods** The genetic diversity with 36 samples of 18 populations of *Oxalis corniculata* and 4 samples of 2 populations of *Oxalis corymbosa* was analyzed by ISSR molecular marker technique. **Results** 10 primers were selected from 59 ISSR primers which amplified 89 DNA bands, and 78 bands among them were polymorphic which the percentage of polymorphic bands was 87.64%, the average DNA bands amplified by each primer were 8.9 bands. The average number of effective allele was 1.388 8 of 40 samples, the Nei's gene diversity and Shannon's information index were 0.349 3 and 0.225 2 by POPGENE1.32 and NTSYS-pc software. These 40 samples were clustered into 4 groups at the genetic similarity coefficient 0.655 8 by UPGMA. **Conclusion** The genetic diversity in 40 samples of *Oxalis corniculata* collected in this paper is rich and there were significant differences in genetic diversity of ISSR between *Oxalis corniculata* and *Oxalis corymbosa*.

**Key words** *Oxalis corniculata* L.; ISSR; genetic diversity

(上接第 849 页)

[12] Pearse R V 2nd, Drolet D W, Kalla K A, et al. Reduced fertility in mice deficient for the POU protein sperm-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7555-60.

[13] Xi W, Wan H T, Zhao Y G, et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di-(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011, 19(7): 2515-27.

## Effect of DEHP on the expression of JAZF1 mRNA and TR4 protein in mouse spermatocyte (GC-2spd) cells

Zhao Jing<sup>1</sup>, Guo Xing<sup>2</sup>, Wu Jiazi<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>School of Public Health, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065;

<sup>2</sup>Women and Children Health Care Center of Luoyang, Luoyang 471000)

**Abstract Objective** To study the effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the expression of JAZF1 mRNA and TR4 protein in GC-2spd cells. **Methods** GC-2spd cells were exposed to the DEHP medium with the final concentrations of 0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ , respectively and then cultured for 24 h. Real-time PCR was used to measure mRNA expression and Western blot was used to detect protein expression. **Results** Compared with the control group, the mRNA expression levels of JAZF1 in 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$  DEHP groups were increased and the protein expression of TR4 in 200  $\mu\text{mol/L}$  DEHP group was decreased, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** DEHP has reproductive toxic effects on spermatogenic cells, which may regulate the expression of TR4 by the JAZF1 and thus affect the male reproductive function.

**Key words** di-2-ethylhexyl phthalate; GC-2 spd cells; JAZF1; testicular orphan receptor 4