

四川林业科技

基于ITS和 $ycf1$ 序列的白及遗传多样性分析

李文俊, 姜丽琼, 刘琼, 肖前刚, 浣杰, 徐志萍 and 杨洪燕

文献标志码: A

Citation: 四川林业科技, 42, 125 (2021) doi: 10.12172/202007070001

View online: <https://doi.org/10.12172/202007070001>

View Table of Contents:

Published by the 《四川林业科技》编辑部

Articles you may be interested in

‘川早1号’子代遗传多样性及杂种优势早期预测

Progeny Genetic Diversity and Early Prediction of Heterosis from ‘Chuanza 1’

四川林业科技. 2020, 41(5): 66; <https://doi.org/10.12172/202005120001>

不同施肥对白及林下栽培生长量的影响

Effects of Different Fertilization on Growth of *Bletilla striata* under Forest Cultivation

四川林业科技. 2017, 34(6): 20; <https://doi.org/10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.06.006>

人为干扰对物种多样性和生态因子的影响分析

Analysis of the Influence of Human Disturbance on Species Diversity and Ecological Factors

四川林业科技. 2017, 38(5): 23; <https://doi.org/10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.05.005>

四川紫花白及无菌播种技术研究

Research on the Aseptic Seeding Technique of *Bletilla striata* with Lilac Flowers

四川林业科技. 2017, 34(6): 51; <https://doi.org/10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.06.013>

基于SSR的8个平欧杂交榛品种指纹图谱构建

Fingerprints of 8 Varieties of *Corylus heterophylla*×*Corylus avellana* Based on SSR Markers

四川林业科技. 2019, 40(2): 5; <https://doi.org/10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.02.002>

滇榛(*Corylus yunnanensis*) SSR引物的筛选

Screening of SSR Markers in *Corylus yunnanensis*

四川林业科技. 2017, 34(6): 55; <https://doi.org/10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.06.014>

基于 ITS 和 *ycf1* 序列的白及遗传多样性分析

李文俊, 姜丽琼*, 刘琼, 肖前刚, 浣杰, 徐志萍, 杨洪燕

成都市农林科学院, 四川 成都 611130

2020-07-07 收稿, 2020-12-24 网络版发表

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



基金项目 成都市农林科学院财政资金项目

李文俊(1976—), 男, 高级工程师, 806284405@qq.com

* 通信作者 157041752@qq.com

摘要 在白及资源调查和收集过程中, 发现白及花型、花色、花期、叶片形态等多个性状变异程度较大。本研究收集了来源于四川和云南的白及资源 30 份, 克隆并分析其 nrDNA ITS 和叶绿体 *ycf1* 基因差异, 发现 *ycf1* 基因差异小, ITS 基因差异较大, 根据 ITS 序列差异, 将白及聚类为 3 个支系, 结合白及的表观性状, 发现白及 ITS 序列与其花期和叶型有相关性, 与花型、花色等其他性状无明显相关, 本研究为白及种质资源收集整理和开发利用提供了理论基础。

关键词 白及; ITS; 叶绿体 *ycf1*; 克隆; 遗传多样性

白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) H.G.Reichenbach] 是兰科白及属的多年生草本植物^[1], 主要分布在云南、四川和贵州等地^[2], 白及具有广泛的药用价值及园林价值, 白及以根茎入药, 具有收敛止血、消肿生肌等功效, 是我国重要的中药材^[3], 亦可作为盆栽室内观赏, 点缀于较为荫蔽的花台、花境或庭院一角^[4]。此外, 白及亦是装裱书画的高品质粘合剂, 并广泛应用于高档美容化妆品及保健等行业^[5]。

白及属植物种间和种内遗传分化强烈^[6], 本研究在白及资源调查和收集过程中, 发现白及表型变异程度较大, 主要表现在株型、花型、花色、花期、花量、花茎、叶片形态、托叶宿存情况及托叶大小及抗逆性等方面, 花色有白色、淡粉色、粉紫色、紫色、深紫色等, 开花时间主要在 3—5 月之间变化, 叶片形态存在宽窄差异, 从表型看, 白及种内差异较大。

nrDNA ITS 序列是位于真核生物 nrDNA18S 和 26S 之间的内含子^[7], 由于进化中的选择压力小, nrDNA ITS 片段在物种水平的变异较快, 有更多的突变位点以区分不同的物种, 常用于物种鉴定和系统进化研究^[8]。而在兰科植物中, Kurt^[9]等指出兰科

植物的 *ycf1* (Hypothetical chloroplast openreading frame 1) 基因具有高度变异性, 并比 *matK* 基因更具有可靠的变异信息位点。本研究收集来源于四川和云南的 30 个白及单株, 克隆并分析其 nrDNA ITS 序列和叶绿体 *ycf1* 序列的差异基因, 以期对白及遗传分化研究鉴定提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在四川和云南采集白及野生种和栽培种共 30 个样本, 样本植株移栽在成都市农林科学院科研基地, 试验时选择成熟个体, 取无病虫害的叶片立即放在液氮中, -80 ℃ 保存待用(见表 1)。

1.2 总 DNA 提取、目的序列的 PCR 扩增与测序

采用植物 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司)提取 DNA, 并参考吴劲松^[10]文献中 ITS、*ycf1* 基因引物及相关体系进行 PCR 扩增、电泳检测、切胶回收、测序(见表 2)。

引用格式: 李文俊, 姜丽琼, 刘琼, 等. 基于 ITS 和 *ycf1* 序列的白及遗传多样性分析[J]. 四川林业科技, 2021, 42(1): 125–129.

Li W J, Jiang L Q, Liu Q, et al. Genetic diversity analysis of *Bletilla striata* based on ITS and *ycf1* genes[J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2021, 42(1): 125–129. doi: 10.12172/202007070001.

表 1 供试材料表

Tab. 1 Basic information of the tested materials

样品编号	取样地点	野生种/栽培种
B_1	云南普洱	栽培种
B_2	云南保山	栽培种
B_3	云南普洱	栽培种
B_4	四川都江堰虹口	野生种
B_5	四川都江堰虹口	野生种
B_6	四川大邑雾山	野生种
B_7	四川沐川	野生种
B_8	四川内江	栽培种
B_9	四川内江	栽培种
B_10	四川水磨	野生种
B_11	四川雅安	野生种
B_12	四川康定	野生种
B_13	四川彭州	栽培种
B_14	四川彭州	栽培种
B_15	云南红河	栽培种
B_16	四川内江	栽培种
B_17	四川内江	栽培种
B_18	四川水磨	野生种
B_19	四川内江	栽培种
B_20	云南普洱	栽培种
B_21	四川汶川	野生种
B_22	云南曲靖	栽培种
B_23	四川重庆	栽培种
B_24	四川水磨	野生种
B_25	四川沐川	野生种
B_26	四川内江	栽培种
B_27	四川内江	栽培种
B_28	四川内江	栽培种
B_29	四川水磨	野生种
B_30	四川彭州	栽培种

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

基因名称		5'-3'
nrDNA ITS	P1	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
	P2	TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG
<i>ycf1</i>	F1	ACCTGAATCATTTTATGTATTGG
	R1	TTTGGTACCTCTTATTATCGACC

1.3 数据分析

利用 DNASTar 软件分析 ITS 和 *ycf1* 序列的长度和 G+C 含量；运用 DNAMAN 工具对 ITS 和 *ycf1* 序列进行多序列比对，分析序列的同源性，采用邻位连接法（Neighbor-Joining method）构建系统进化

树，选择检验方法为“Bootstrap method”，重复抽样次数为 1000，应用软件 MEGA7.0^[11]（Molecular evolution genetics analysis）分子进化遗传分析软件分析系统进化关系。

2 结果与分析

2.1 序列特征

对 30 个白及样本的 nrDNA ITS 和叶绿体 *ycf1* 序列进行扩增，如表 3 所示，获得 ITS 序列长度为 633~742 bp，GC 含量为 59.97%~61.64%，*ycf1* 序列长度为 864~969 bp，GC 含量为 27.76%~28.47%。

表 3 序列长度及 GC 含量

Tab. 3 Sequence length and GC content

编号	ITS 序列长度/bp	GC 含量/%	<i>ycf1</i> 序列长度/bp	GC 含量/%
B_1	703	61.59	890	28.31
B_2	703	61.45	907	27.89
B_3	696	61.64	969	27.76
B_4	704	61.08	894	28.19
B_5	702	61.40	900	28.22
B_6	728	60.99	900	28.11
B_7	704	60.80	864	28.36
B_8	703	60.46	881	28.15
B_9	726	60.74	891	28.28
B_10	713	60.87	904	28.21
B_11	663	60.03	902	27.94
B_12	664	60.24	886	28.33
B_13	716	60.61	930	28.28
B_14	721	61.03	885	28.47
B_15	705	61.28	893	28.22
B_16	721	60.61	905	27.96
B_17	719	60.78	907	28.22
B_18	720	60.69	895	28.22
B_19	710	61.13	900	28.11
B_20	699	61.37	900	28.11
B_21	711	61.04	893	28.22
B_22	717	60.95	902	28.05
B_23	716	61.59	910	28.02
B_24	717	61.09	906	28.15
B_25	668	60.48	873	28.29
B_26	712	60.67	907	28.00
B_27	716	60.89	884	28.28
B_28	717	60.81	899	28.14
B_29	730	60.82	909	28.16
B_30	742	59.97	951	28.08

2.2 遗传多样性

通过比对, 确定本研究涉及材料 nrDNA ITS 序列和叶绿体 *ycf1* 序列存在不同程度的变异, 根据 *ycf1* 基因共鉴定出 5 个单倍型, 存在 4 个变异位点, B_4 和 B_5 属于 B 型, B_11 属于 C 型, B_12 属于 D 型, B_16 属于 E 型, 其余 25 个样本属于 A 型, 具体变异情况见表 4。

相比较叶绿体 *ycf1* 基因, nrDNA ITS 基因变异程度较大, 共鉴定出 11 个单倍型, 存在 32 个变异位点, 其中 B_1、B_2、B_3、B_6、B_15、B_23 属于 A 型, B_4、B_5、B_14 属于 B 型, B_7、B_16、B_17、B_18、B_25、B_26、B_27、B_28 属

于 C 型, B_8、B_9、B_10 属于 D 型, B_19、B_20、B_21、B_29 属于 E 型, B_11、B_12、B_13、B_22、B_24、B_30 分别属于 F、G、H、I、J、K 型, 具体变异情况见表 5。

表 4 叶绿体 *ycf1* 基因变异情况
Tab. 4 Variation of *ycf1* genes in chloroplasts

单倍型	1	2	3	4
A型	—	T	G	C
B型	—	A	G	C
C型	—	T	A	A
D型	—	T	A	C
E型	A	T	G	C

注: “.” 表示与单倍型 A 型核苷酸相同, “—” 表示缺失或插入。

表 5 nrDNA ITS 基因变异情况
Tab. 5 Variation of nrDNA ITS genes

单倍型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	C	—	G	T	T	C	A	C	C	G	A	A	C	T	G	G
B	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	.	—	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A
D	.	—	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A
E	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F	T	—	A	C	.	T	G	T	T	.	G	G	T	.	A	A
G	T	—	A	C	.	T	G	T	T	.	G	G	T	.	A	A
H	T	A	A	C	.	T	G	T	T	T	G	G	T	.	A	A
I	T	—	A	C	C	T	G	T	T	.	G	G	T	C	A	A
J	.	—	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
K	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

单倍型	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
A	C	A	C	G	C	—	T	C	A	G	—	G	T	C	T	C
B	.	.	.	.	.	—	.	.	.	T	—	.	.	.	.	.
C	.	.	.	A	.	—	.	.	.	.	—	A	.	.	.	.
D	.	.	.	A	.	—	.	.	.	.	—	.	.	.	.	.
E	.	.	.	.	.	—	.	.	.	T	—	.	.	T	.	.
F	T	.	—	A	T	—	.	T	.	.	—	.	G	.	C	T
G	T	G	—	A	T	—	.	T	.	.	G	.	G	.	C	T
H	.	.	—	A	T	—	C	T	G	.	C	.	G	.	C	T
I	T	.	.	A	T	—	.	T	.	.	—	.	G	.	C	T
J	.	.	.	A	.	—	.	.	.	.	—	.	.	.	.	.
K	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	—	.	.	T	.	.

注: “.” 表示与单倍型 A 型核苷酸相同, “—” 表示缺失或插入。

本研究中, 共得到白及 30 条 ITS 序列, 共鉴定出 11 个单倍型, 表现出很高的杂合性, 构建 NJ 树, 发现 30 份白及材料分为 3 个支系, A 型、

B 型、E 型聚为一支, B_8 和 F、G、H、I、J、K 型聚为一支, C 型和 D 型聚为一支 (见图 1)。

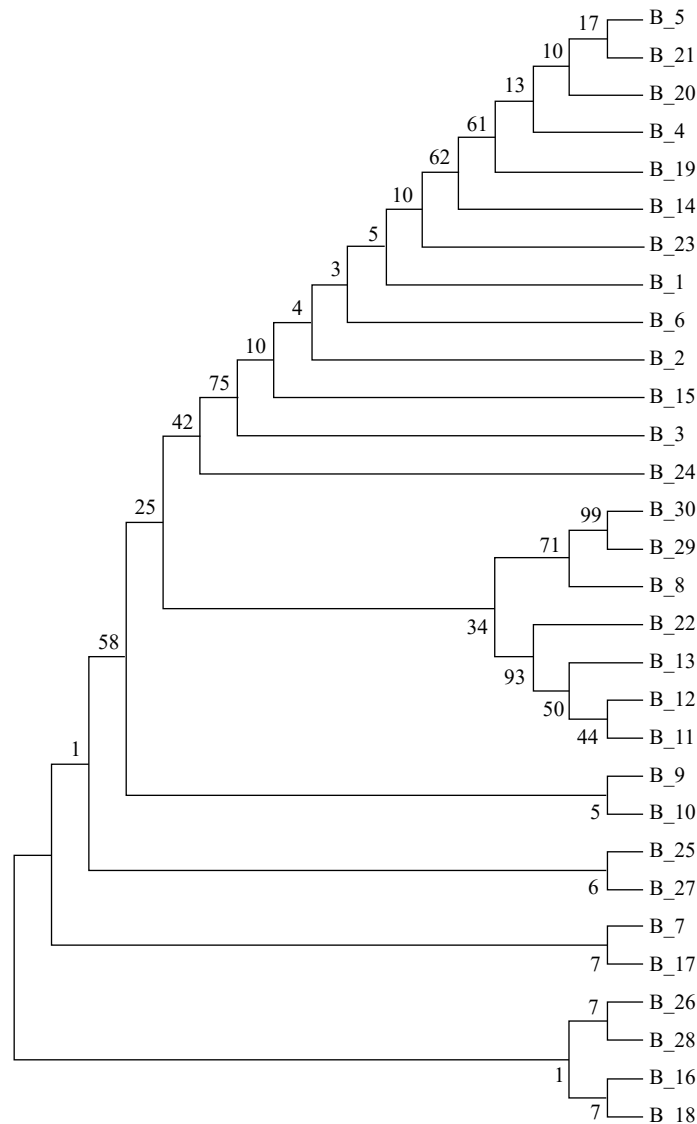


图1 基于 ITS 序列的白及系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *Bletilla striata* based on ITS sequence

3 结论与讨论

白及属植物具有较高的遗传多样性。孙宇龙^[12]等通过 SRAP 分子标记探讨了 12 个白及野生居群的遗传多样性和居群遗传结构,表明白及物种有着丰富的遗传多样性,认为白及居群间存在中等水平的遗传分化。周天华^[13]等构建白及 SSR 指纹图谱,认为白及属在种间水平均有较高的遗传多样性,物种间遗传分化强烈,物种间的基因流较弱。

本研究比较 30 个白及样本的 ITS 序列和 *ycf1* 序列,发现 *ycf1* 序列变异较小,ITS 序列变异较大,种内遗传多样性丰富。相比较 A 型, B_12、B_13、B_13 和 B_22 的 ITS 序列变异较大,分别发生了 20、22、24 和 21 个基因位点变异,此四个样本变异情况相似,且在表观上均表现出叶型狭长、花期晚

的性状,根据 ITS 序列差异,将 30 份白及材料聚类为 3 个支系,结合白及的表观性状,发现白及 ITS 序列与其花期和叶型有相关性,与花型、花色等其他性状无明显相关。

种质资源是中药材遗传育种和品种选育的基础,目前,市场上流通的白及药材种质来源广泛,质量参差不齐。种源不清、种子种苗质量参差不齐,是影响白及规范化种植和白及药材质量的重要因素^[14]。本研究收集白及种质资源,克隆并分析白及 nrDNA ITS 和叶绿体 *ycf1* 序列,为白及种质资源开发利用奠定了基础。后续将对这批白及种质资源的化学成分、抗逆性和其他品质性状进行深入研究,以期选育产量高、抗逆性强、品质优的新品种提供材料基础。

参考文献

- [1] 任凤鸣, 刘艳, 李滢, 等. 白及属药用植物的资源分布及繁育[J]. 中草药, 2016, 47(24): 4478–4487.
- [2] 周先建, 张美, 林娟, 等. 四川白及属药用植物资源调查[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(22): 178–180.
- [3] 卢鄧凯, 洪溢, 金栋, 等. 白及的综合利用价值及繁殖栽培技术探讨[J]. 南方农业, 2019, 13(28): 10–13.
- [4] 朱娇, 黄卫昌, 曹建国, 等. 我国白及属植物资源评价及其筛选[J/OL]. 热带作物学报: 1–15[2020-04-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20200224.1743.002.html>.
- [5] 林立, 聂鲜钰, 陆春云, 等. 基于多糖和白及胶及矿质元素分析的白及种质资源特征研究[J]. 中药材, 2019, 42(5): 1000–1006.
- [6] 黎君. 白及的遗传多样性分析与 DNA 指纹图谱研究[D]. 陕西理工大学, 2017.
- [7] 段义忠, 王建武, 亢福仁, 等. 蒙古扁桃 nrDNA ITS 和 cpDNA trnH-psbA 序列分子进化特点研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 3035–3041.
- [8] 宋爽, 周洋帆, 黄丽, 等. ITS2 条形码对白及属植物的初步分析研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2017, 32(1): 95–100.
- [9] Kurt M, Neubig W, Mark W, et al. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*[J]. *Plant Syst Evol*, 2009, 277: 75–84.
- [10] 吴劲松, 张宇思, 刘薇, 等. 白及属药用植物 DNA 条形码的确立及其应用[J]. 药学报, 2014, 49(10): 1466–1474.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599.
- [12] 孙宇龙. 白及的假鳞茎诱导、遗传资源鉴定与评价的研究[D]. 南京师范大学, 2015.
- [13] 周天华, 黎君, 丁家玺, 等. 白及种质资源及其近缘种的 SSR 指纹图谱研究[J]. 西北植物学报, 2017, 37(4): 673–681.
- [14] 林立. 白及种质资源评价及种子种苗质量标准研究[D]. 贵州大学, 2019.

Summary for “基于 ITS 和 *ycf1* 序列的白及遗传多样性分析”

Genetic Diversity Analysis of *Bletilla striata* Based on ITS and *ycf1* Genes

LI Wenjun, JIANG Liqiong*, LIU Qiong, XIAO Qiangang, HUAN Jie, XU Zhiping, YANG Hongyan

Chengdu Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Chengdu 61113, China

* Corresponding author, 157041752@qq.com

Abstract During the investigation and collection of *Bletilla striata* resources, it was found that many characteristics of *Bletilla striata* such as flower type, flower color, florescence, leaf shape and so on had great variation degrees. In this study, we collected 30 accessions of *Bletilla striata* resources from Sichuan and Yunnan province, cloned and analyzed their nrDNA ITS and chloroplast *ycf1* gene differences, and found that *ycf1* gene has little difference and ITS gene has large difference. According to the differences of ITS sequences, *Bletilla striata* was clustered into 3 branches. Combined with the apparent characteristics of *Bletilla striata*, it was found that the ITS sequences of *Bletilla striata* had obvious correlation with florescence and leaf type, but had no obvious correlation with other characteristics such as flower type and color. This study provided a theoretical basis for the collection, development and utilization of *Bletilla striata* germplasm resources.

Key words *Bletilla striata*; ITS; Chloroplast *ycf1*; Cloning; Genetic diversity

doi: [10.12172/202007070001](https://doi.org/10.12172/202007070001)