

不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析

吕琳, 秦民坚^①, 贺丹霞, 顾瑶华

(中国药科大学中药资源学研究室 教育部现代中药研究重点实验室, 江苏 南京 210038)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术对来源于不同地区的 19 份药用菊花 (*Dendranthema morifolium* Ramat.) 种源、4 份野菊 (*D. indicum* L.) 种源、1 份菊花脑 (*D. nankingese* Hand.-Mazz.) 种源和 1 份杂交菊花‘黄金菊’ (*D. indicum* × *D. morifolium* ‘Gongju’) 种源进行了遗传关系分析。从 38 条引物中筛选出 6 条引物, 共扩增出 66 条带, 平均多态性条带百分率达 95.5%。聚类分析结果表明, 取 $\lambda = 16$, 25 份种源可分成 2 大组, 即野菊、菊花脑和杂交菊花归为一组, 19 份药用菊花种源归为一组; 19 份药用菊花种源又可根据原产地进一步分成 2 组, 大部分原产北方的药用菊花种源的遗传关系较近, 而大部分南方栽培的药用菊花种源也有相对较近的遗传关系。

关键词: 药用菊花; 野菊; 菊花脑; 杂交菊花; ISSR 分子标记; 亲缘关系

中图分类号: R282.5; S567.2.021 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-0978(2008)01-0007-06

Analyses of ISSR molecular marker and genetic relationship of different provenances of *Dendranthema morifolium*, *D. indicum* and *D. nankingese* LÜ Lin, QIN Min-jian^①, HE Dan-xia, GU Yao-hua (Department of Resources Science of Traditional Chinese Medicinal Materials, Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicines of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(1): 7-12

Abstract: Analysis of genetic relationships among nineteen provenances of *Dendranthema morifolium* Ramat., four provenances of *D. indicum* L., one provenance of *D. nankingese* Hand.-Mazz. and one hybrid provenance of *D. indicum* × *D. morifolium* ‘Gongju’ from different locations was carried out by using ISSR molecular marker technique. The results showed that six primers of ISSR were selected from thirty-eight primers and sixty-six bands were amplified by the six primers. Average percentage of polymorphic band was 95.5%. The results of cluster analysis indicated that twenty-five provenances could be divided into two groups at $\lambda = 16$, one group including *D. indicum*, *D. nankingese* and a hybrid, another group including nineteen provenances of *D. morifolium*, the latter was further divided into two groups according to geographic origins. Genetic relationships among most of *D. morifolium* provenances from the Northern of China were close and genetic relationships among most of *D. morifolium* provenances from the Southern of China were also close.

Key words: *Dendranthema morifolium* Ramat.; *D. indicum* L.; *D. nankingese* Hand.-Mazz.; *D. indicum* × *D. morifolium* ‘Gongju’; ISSR molecular marker; genetic relationship

菊花 (*Dendranthema morifolium* Ramat.) 为常用中药材之一, 在中国有二千多年的栽培历史。药用菊花除亳菊、滁菊、杭菊和贡菊^[1] 外, 还包括济菊、祁菊以及近年来江苏射阳从杭州引种并逐渐形成规模的白菊花等。由于长期引种栽培及品种选育等原因, 造成药用菊花品种 (系) 混乱、种质不清, 为进一步明确各品种 (系) 药用菊花间的遗传关系, 许多学者采用多种手段对不同品种 (系) 的药用菊花进行

了研究和探讨。王德群等^[2-3] 对药用菊花的产地及品种演变等作了较为全面的调查; 何先元^[4] 和徐文斌^[5] 等分别对各道地产地或不同栽培型药用菊花

收稿日期: 2007-01-23

基金项目: 中国药科大学引进人才科研启动基金 (211068)

作者简介: 吕琳 (1982—), 女, 河北安国人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物种质资源与质量相关性研究。

^① 通讯作者 E-mail: minjianqin@sina.com

进行了调查并对其内在质量进行了比较;白雁等^[6]利用红外光谱和聚类分析法较明确地区分出不同品种的药用菊花;还有许多学者对药用菊花野生近缘种的质量进行了比较分析,如吕琳等对不同种源野菊及菊花脑进行了挥发油成分的比较分析^[7]。

近年来,分子标记技术被广泛用于植物种质遗传多样性研究。用 RAPD 和 AFLP 等分子标记技术对观赏菊花的研究证明,对于菊花这种高度网状进化的类群而言,分子标记技术是一种极为有效的分析手段^[8-12];徐文斌等^[13]采用 RAPD 技术对药用菊花进行了研究。由于不同分子标记技术各有优缺点,因此,其研究结果可相互佐证,为深入了解药用植物的遗传多样性及种质鉴别奠定分子基础。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 标记技术引物设计较简单,不需要预知 SSR 两端的碱基序列,多态性高,重复性好,并且能够提供更多的遗传信息,目前该技术已应用于多种动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位及遗传多样性等方面的研究中^[14]。

作者采用 ISSR 分子标记技术对来源于不同产区的药用菊花及其近缘植物野菊 (*D. indicum* L.) 和菊花脑 (*D. nankingese* Hand. -Mazz.) 种源以及杂交菊花‘黄金菊’ (*D. indicum* × *D. morifolium* ‘Gongju’) 进行比较研究,以明确这些种源的遗传关系,为药用菊花的规范化栽培提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

25 份种源包括药用菊花 19 份、野菊 4 份、菊花脑 1 份和杂交菊花‘黄金菊’ 1 份,原产地见表 1。每个种源随机取样 10 株,加入硅胶密封,于 -20 °C 冰箱中干燥保存,来源于江苏南京的样品均为从中国药科大学药用植物园中采集的新鲜样品。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取及检测 采用改良的 CTAB 法提取基因组总 DNA,用质量体积分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,0.5 μg · mL⁻¹ EB 溶液浸泡 15 ~ 20

表 1 供试的药用菊花、野菊及菊花脑种源的来源

Table 1 Origins of different provenances of *Dendranthema morifolium* Ramat., *D. indicum* L. and *D. nankingese* Hand. -Mazz.

| 种源 Provenance | 产地 Location |
|--|---|
| 杭白菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Hangbaiju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 菊花脑 <i>D. nankingese</i> | 江苏南京 Nanjing of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 中华贡菊 <i>D. morifolium</i> ‘Zhonghuagongju’ | 山东汶上 Wenshang of Shandong Province (栽培 Cultivated) |
| 茶菊 <i>D. morifolium</i> ‘Chaju’ | 河南温县 Wenxian of He’nan Province (栽培 Cultivated) |
| 野菊 <i>D. indicum</i> | 江西 Jiangxi Province (野生 Wild) |
| 济菊 <i>D. morifolium</i> ‘Jiju’ | 山东嘉祥 Jiaxiang of Shandong Province (栽培 Cultivated) |
| 野菊 <i>D. indicum</i> | 安徽黄山 Huangshan of Anhui Province (野生 Wild) |
| 大毫菊 <i>D. morifolium</i> ‘Boju’ (Daboju) | 安徽亳州 Bozhou of Anhui Province (栽培 Cultivated) |
| 小毫菊 <i>D. morifolium</i> ‘Boju’ (Xiaoboju) | 安徽亳州 Bozhou of Anhui Province (栽培 Cultivated) |
| 大白菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Dabaiju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 小白菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Xiaobaiju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 小白菊 (怀菊) <i>D. morifolium</i> ‘Huaiju’ (Xiaobaiju) | 河南温县 Wenxian of He’nan Province (栽培 Cultivated) |
| 黄金菊 <i>D. indicum</i> × <i>D. morifolium</i> ‘Gongju’ | 江苏南京 Nanjing of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 红心菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Hongxinju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 小黄菊 1 号 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (No. 1 of Xiaohuangju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 小黄菊 2 号 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (No. 2 of Xiaohuangju) | 浙江桐乡 Tongxiang of Zhejiang Province (栽培 Cultivated) |
| 长瓣菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Changbanju) | 江苏射阳 Sheyang of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 滁菊 <i>D. morifolium</i> ‘Chuju’ | 安徽滁县 Chuxian of Anhui Province (栽培 Cultivated) |
| 野菊 <i>D. indicum</i> | 江苏南京 Nanjing of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 野菊 <i>D. indicum</i> | 江苏南京 Nanjing of Jiangsu Province (栽培 Cultivated) |
| 祁菊 <i>D. morifolium</i> ‘Qiju’ | 河北安国 Anguo of Hebei Province (栽培 Cultivated) |
| 贡菊 <i>D. morifolium</i> ‘Gongju’ | 安徽歙县 Shexian of Anhui Province (栽培 Cultivated) |
| 大洋菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Dayangju) | 浙江桐乡 Tongxiang of Zhejiang Province (栽培 Cultivated) |
| 小洋菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Xiaoyangju) | 浙江桐乡 Tongxiang of Zhejiang Province (栽培 Cultivated) |
| 异种大洋菊 <i>D. morifolium</i> ‘Hangju’ (Yizhongdayangju) | 浙江桐乡 Tongxiang of Zhejiang Province (栽培 Cultivated) |

min, Bio-Rad 凝胶成像系统检验 DNA 质量。提取到的 DNA 样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存、备用。

1.2.2 ISSR 分析方法及产物检测 任意选取 2 份 DNA 样品, 分别用 38 个 ISSR 引物(其中 36 个根据 British Columbia 大学公布的序列设计, 2 个参考相关文献^[15]设计, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成)进行扩增, 经过反复实验, 选择扩增条带清晰、反应稳定且多态性较好的 6 个 ISSR 引物对 25 个 DNA 样品进行扩增。

PCR 反应体系的总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 包括 $20\sim 80\text{ ng}$ 模板 DNA, $2.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$, $1\times\text{Taq DNA 聚合酶缓冲液}$ (含有 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$, $\text{pH } 9.0$), $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, $d\text{ATP}$ 、 $d\text{GTP}$ 、 $d\text{CTP}$ 和 $d\text{TTP}$ 各 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1.0 U Taq DNA 聚合酶 。

PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min , 共 40 个循环反应; 最后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min 。

反应产物以 DL2000 为分子量标记, 用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EB 溶液浸泡 $15\sim 20\text{ min}$, 用凝胶成像系统拍照。如果扩增条带没有明显多态性, 则用质量体积分数 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EB 溶液浸泡 $15\sim 20\text{ min}$, 再用凝胶成像系统拍照。

1.3 数据统计与分析

电泳图谱中的每一条带(DNA 片段)均记为 1 个分子标记, 代表 1 个引物的结合位点。根据各分子标记的有无及迁移率, 统计所有二元数据; 有带(显性)记为“1”, 无带(隐性)记为“0”, 强带和弱带的赋值均为“1”。用 SPSS 分析软件中的 Jaccard 方法计算样品间的遗传相似系数(genetic similarity, GS), 用 Ward's method 对 ISSR 数据进行聚类分析, 并建立系统发育树状图。

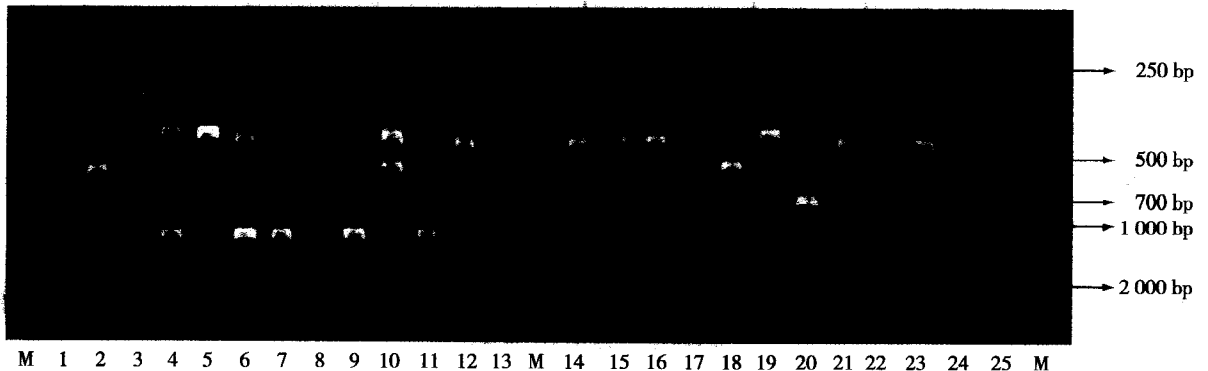
2 结果和分析

2.1 ISSR 扩增产物的多态性分析

通过预实验, 从 38 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性高且重复性较好的 6 个引物, 并对 25 份 DNA 样品进行 ISSR 分子标记分析, 其中引物 S3 扩增产物的电泳图谱见图 1, 6 个引物的序列及其扩增结果见表 2。由表 2 可见, 6 个引物共扩增出条带 66 条, 其中多态性条带 63 条, 平均多态性条带百分率达 95.5% , 引物 ISSR1、S3 和 S23 扩增产物的多态性条带百分率最高, 均可达到 100.00% 。统计发现, 扩增条带的长度为 $250\sim 2\text{ }000\text{ bp}$ 。

2.2 聚类分析

根据 ISSR 结果计算供试的药用菊花、野菊、菊



M: 分子量标记 Marker (DL2000); 1. 杭白菊 *Dendranthema morifolium* 'Hangju' (Hangbaiju); 2. 菊花脑 *D. nankingense*; 3. 中华贡菊 *D. morifolium* 'Zhonghuagongju'; 4. 茶菊 *D. morifolium* 'Chaju'; 5. 野菊 *D. indicum*, 江西 Jiangxi Province (野生 Wild); 6. 济菊 *D. morifolium* 'Jiju'; 7. 野菊 *D. indicum*, 安徽黄山 Huangshan of Anhui Province (野生 Wild); 8. 大毫菊 *D. morifolium* 'Boju' (Daboju); 9. 小毫菊 *D. morifolium* 'Boju' (Xiaoboju); 10. 大白菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Dabaiju); 11. 小白菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Xiaobaiju); 12. 小白菊(杯菊) *D. morifolium* 'Huaju' (Xiaobaiju); 13. 黄金菊 *D. indicum* \times *D. morifolium* 'Gongju'; 14. 红心菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Hongxinju); 15. 小黄菊 1 号 *D. morifolium* 'Hangju' (No. 1 of Xiaohuangju); 16. 小黄菊 2 号 *D. morifolium* 'Hangju' (No. 2 of Xiaohuangju); 17. 长瓣菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Changbanju); 18. 滁菊 *D. morifolium* 'Chuju'; 19. 野菊 *D. indicum*, 原产江苏 Jiangsu Province (栽培于南京 Cultivated in Nanjing); 20. 野菊 *D. indicum*, 原产湖北 Hubei Province (栽培于南京 Cultivated in Nanjing); 21. 祁菊 *D. morifolium* 'Qiju'; 22. 贡菊 *D. morifolium* 'Gongju'; 23. 大洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Dayangju); 24. 小洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Xiaoyangju); 25. 异种大洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Yizhongdayangju)。

图 1 引物 S3 对药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 扩增图谱

Fig. 1 ISSR pattern of *Dendranthema morifolium* Ramat., *D. indicum* L. and *D. nankingense* Hand.-Mazz. amplified by primer S3

花脑及杂交菊花 25 个种源的平均遗传相似系数为 0.40, 最大值达到 0.58, 最小值仅为 0.13。总体上看, 由于扩增条带的多态性较高, 各种源间的遗传相

似系数相对偏低。

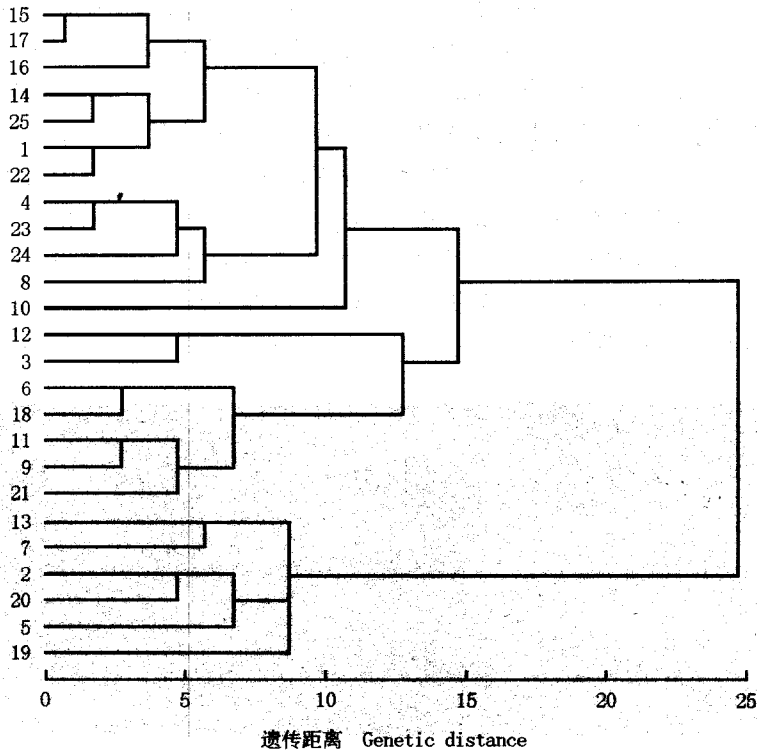
药用菊花、野菊、菊花脑及杂交菊花各种源的聚类分析结果见图2。取 $\lambda = 16$, 供试的 25 份种源可

表2 用于药用菊花、野菊和菊花脑 ISSR 分析的引物序列及扩增结果

Table 2 Primer sequences used for ISSR analysis of *Dendranthema morifolium* Ramat., *D. indicum* L. and *D. nankingense* Hand.-Mazz. and amplification results

| 引物 Primer | 序列 ¹⁾ Sequence ¹⁾ | 长度/bp Length | 条带数 Number of band | 多态性条带数 Number of polymorphic band | 多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band |
|--------------|--|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|--|
| ISSR1 | (CT) ₈ AGG | 250-2 000 | 11 | 11 | 100.0 |
| S2 | (CT) ₈ A | 500-2 000 | 8 | 7 | 87.5 |
| S3 | (TC) ₈ A | 250-2 000 | 10 | 10 | 100.0 |
| S16 | (CT) ₈ RC | 250-2 000 | 16 | 15 | 93.8 |
| S18 | (CTC) ₆ | 700-2 000 | 8 | 7 | 87.5 |
| S23 | DVD (TC) ₇ | 250-2 000 | 13 | 13 | 100.0 |
| 总计 Total | | | 66 | 63 | |
| 平均 Mean | | | 11 | | 95.5 |

¹⁾ R = A or G; D = A, G or T; V = A, C or G.



1. 杭白菊 *Dendranthema morifolium* 'Hangju' (Hangbaiju); 2. 菊花脑 *D. nankingense*; 3. 中华贡菊 *D. morifolium* 'Zhonghuagongju'; 4. 茶菊 *D. morifolium* 'Chaju'; 5. 野菊 *D. indicum*, 江西 Jiangxi Province (野生 Wild); 6. 济菊 *D. morifolium* 'Jiju'; 7. 野菊 *D. indicum*, 安徽黄山 Huangshan of Anhui Province (野生 Wild); 8. 大毫菊 *D. morifolium* 'Boju' (Daboju); 9. 小毫菊 *D. morifolium* 'Boju' (Xiaoboju); 10. 大白菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Dabaiju); 11. 小白菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Xiaobaiju); 12. 小白菊(怀菊) *D. morifolium* 'Huaiju' (Xiaobaiju); 13. 黄金菊 *D. indicum* × *D. morifolium* 'Gongju'; 14. 红心菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Hongxinju); 15. 小黄菊1号 *D. morifolium* 'Hangju' (No. 1 of Xiaohuangju); 16. 小黄菊2号 *D. morifolium* 'Hangju' (No. 2 of Xiaohuangju); 17. 长瓣菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Changbanju); 18. 滁菊 *D. morifolium* 'Chuju'; 19. 野菊 *D. indicum*, 原产江苏 Jiangsu Province (栽培于南京 Cultivated in Nanjing); 20. 野菊 *D. indicum*, 原产湖北 Hubei Province (栽培于南京 Cultivated in Nanjing); 21. 祁菊 *D. morifolium* 'Qiju'; 22. 贡菊 *D. morifolium* 'Gongju'; 23. 大洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Dayangju); 24. 小洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Xiaoyangju); 25. 异种大洋菊 *D. morifolium* 'Hangju' (Yizhongdayangju).

图2 基于 ISSR 分析的 25 个药用菊花、野菊和菊花脑种源的树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis based on ISSR analysis of twenty-five provenances of *Dendranthema morifolium* Ramat., *D. indicum* L. and *D. nankingense* Hand.-Mazz.

明显分为2个大组,一组包括野菊、菊花脑及杂交菊花,另一组包含全部的19个药用菊花种源。取 $\lambda = 14$,可按不同产地的地理区域将药用菊花组细分成2个小组:一组为北方种源,另一组为南方种源。聚类分析结果表明,大部分产自南方的菊花种源的遗传关系较近,大部分产自北方的菊花种源也具有较近的遗传关系,与传统的菊花分类结果一致。

3 结论和讨论

3.1 条带多态性的意义

从ISSR扩增产物的电泳图谱可以看出,25个供试种源的主条带较为一致,说明供试种源间具有一定的遗传关系。另外,各种源的多态性条带百分率较高,说明ISSR标记能有效区分这些遗传关系很近的种源。

3.2 不同种源间遗传关系的讨论

聚类分析结果表明,25个供试种源可聚为两大组,其中野菊、菊花脑和杂交菊花聚为一组,所有药用菊花聚为另一组。对于菊花来说,野菊、菊花脑和杂交菊花可被看作外类群,其中菊花脑在分类上曾存在争议,有人认为它是野菊的变种,后来经染色体原位杂交技术证明菊花脑应为独立种^[8-9]。菊花脑和野菊在外部形态等方面十分相似,表明二者具有很近的亲缘关系,本实验结果将它们聚为一大组,可能与ISSR分子标记所代表的表征性状有关。‘黄金菊’是神农香菊(*D. indicum* var. *aromaticum*)和贡菊(*D. morifolium* ‘Gongju’)的杂交品种,花较小,接近于野菊,但舌状花和管状花数量比野菊多,其亲本之一的神农香菊是湖北野菊的一个变种,研究结果将‘黄金菊’和野菊聚为一组,说明扩增出的特异性基因片断中野菊表型的遗传表达占优势。

一般认为,目前常用的菊花与长江南北分布的四大名菊(即杭菊、贡菊、滁菊和亳菊)有密切的亲缘关系。传统上认为,以长江为界,江南的杭菊和贡菊以茶用为主,兼顾药用;江北的滁菊和亳菊以药用为主,兼顾茶用。据文献记载,北方的药用菊花与现在的亳菊和小亳菊有密切关系,济菊、祁菊以及现在怀菊品种中的小白菊都是在清代引种于亳菊,而亳菊又来源于早期的怀菊。一般认为,南方的药用菊花(如杭菊和贡菊等)都是引种于浙江的茶菊,通过产地变迁、优良品种选育等逐渐发展成现在的多个品

种(系)^[2-3]。聚类分析结果显示,杭白菊和贡菊的亲缘关系较近,其中产自浙江桐乡的小黄菊和江苏射阳的小黄菊及长瓣菊的遗传关系较近,证实了前人的推测。在聚为一大组的药用菊花种源中,怀菊、祁菊、济菊、小亳菊、中华贡菊、滁菊及江苏射阳栽培的小白菊遗传距离较近,形成一个分支,它们大部分为北方菊花品种(系);而杭白菊、贡菊,江苏射阳栽培的长瓣菊、大白菊、小黄菊、红心菊,浙江桐乡的小黄菊、大洋菊、小洋菊、异种大洋菊以及河南的茶菊遗传关系较接近,形成另一个分支,主要是南方的菊花品种(系)。上述种源中,江苏射阳产的药用菊花主要引种于杭菊,大部分射阳产的药用菊花和杭菊聚在一起,证实了它们之间的亲缘关系。以上的研究结果与传统的分类结果基本一致,但其中也存在某些特例,其成因分析如下:

1) 在南方菊花分支中出现了收集于河南的茶菊和安徽亳州的大亳菊。文献上未见河南茶菊来源的具体记载,也非市场上菊花药材的主流品种,当地主要以茶用为主。茶菊的形态与杭菊接近,舌状花白色、4~5层;管状花黄色、数量较多,但茶菊花瓣常带淡紫色。一般认为,菊花的花色最初为黄色和白色,以后相继演化出其他颜色,其花色一般是偏母性遗传,但是黄色演化出的其他颜色常表现出更强的遗传能力^[16],因此,花瓣淡紫应该是种质渗透的结果。

大亳菊当地称之为“大马牙”,在市场上也作为亳菊出售,但一般认为其质量较小亳菊差,形态上与小亳菊也有一定的差别,花形较大、管状花数量较多。对早期亳菊和后来亳菊的评价完全相反,有人认为大亳菊即为亳菊早期的栽培品种,而小亳菊是清朝从河南引种、亳州药材市场形成后发展而成的品种^[2],因此大亳菊和小亳菊的来源不同。本实验结果显示,大亳菊和茶菊及大洋菊、小洋菊的遗传关系较近,这几种药用菊花在形态上与观赏菊花中的小花型菊花品种相似,推测它们可能由小花型观赏菊花培育而来,这一推测有待进一步研究证实。

2) 北方菊花分支主要包括怀菊中的小白菊、中华贡菊、济菊、滁菊、射阳小白菊、小亳菊和祁菊。其中,中华贡菊种源收集于山东汶上,从名称上看似乎和南方贡菊有一定联系,但因其形态和贡菊差异较大,与贡菊的遗传距离也较远,据此分析认为,中华贡菊可能是当地培育形成的品种,其亲缘关系则与

原产北方的药用菊花较为接近。

聚类分析结果表明,产于山东的济菊和滁菊的遗传关系较近。江苏射阳产的药用白菊花在市场上也做杭菊出售,主要是引种于杭菊选育出的品种(系),亲缘关系与杭菊也就是南方菊花较近。但在本研究结果中,江苏射阳产的小白菊和北方的小毫菊聚在一起,其原因还有待进一步的研究。

综上所述,本研究结果基本支持药用菊花的传统分类观点,同时也表明使用 ISSR 分子标记对亲缘关系十分相近的种源进行研究有一定优势。徐文斌等^[13]用 RAPD 法对 22 种药用菊花进行过研究,发现江苏射阳产菊花与杭菊的亲缘关系很近,但大部分的药用菊花样品仅部分按地区聚类,多数单独聚成一支,无法更准确地推断不同地区菊花品种(系)间的亲缘关系。本研究结果表明,利用 ISSR 分子标记进行分析,对不同产地各菊花品种(系)间亲缘关系的阐明比 RAPD 分析更加清楚。有研究表明,ISSR 分子标记技术的分辨能力较 RAPD 更高,能更好地检测出种间的遗传差异性和种内的遗传相似性;尽管这两种标记对于种内不同基因型个体间遗传差异的区分趋势相近,但结果则不尽相同^[17]。

3.3 对实验方法的讨论

与常用的分子标记方法(如 AFLP、SSR 等)相比,ISSR 分子标记不需要单独设计引物,实验成本较低,技术也相对简单;与 RAPD 分析方法相比,ISSR 反应更为稳定、结果更可靠,在遗传多样性研究中有特殊的优势。但在实验过程中作者也发现,有些 ISSR 引物反应不稳定,可能是由于 ISSR 引物含有重复序列,与它结合的基因组 DNA 内靶序列在 DNA 复制过程中存在滑动和不均等现象,在不同品种或个体之间的重复次数差异较大,易引起引物结合位点和两结合位点间片段长度的差异^[18]。因此,ISSR 引物多数为重复序列加锚定碱基,以增加其特异性和稳定性。但有学者认为,使用 3'锚定的引物将难以观察到等位基因,使用 5'锚定引物又会降低其特异性^[19]。因此,合适的 ISSR 引物需要经过大量的实验和筛选。另外,虽然 ISSR 反应较 RAPD 反应稳定,但它对反应浓度尤其是模板浓度较为敏感,模板浓度差异可导致扩增的条带数量发生较大变化,虽然条带数量的变化可能是由于非特异条带的减少而引起的,但模板质量或浓度的差别的确能使实验结果产生较大差异,因此,ISSR 分子标记的最佳反应条

件需要一定时间的摸索。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 218.
- [2] 王德群, 梁益敏, 刘守金. 中国菊花品种演变[J]. 中国中药杂志, 1994, 24(10): 584-587.
- [3] 王德群, 刘守金, 梁益敏. 中国药用菊花的产地考察[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 522-525.
- [4] 何先元, 郭巧生, 徐文斌, 等. 道地药材菊花形成的原因[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(10): 54-55.
- [5] 徐文斌, 郭巧生, 李彦农, 等. 药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1645-1648.
- [6] 白雁, 鲍红娟, 王东, 等. 红外光谱和聚类分析法在药用菊花产地分类鉴别中的应用[J]. 中药材, 2006, 29(7): 663-665.
- [7] 吕琳, 秦民坚, 吴刚, 等. 不同种源野菊及菊花脑花的挥发油成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 53-57.
- [8] 戴思兰, 陈俊愉. 中国菊属一些种的分支分类学研究[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15(1): 27-34.
- [9] 戴思兰, 王文奎, 黄家平. 菊属系统学及菊花起源的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(5/6): 230-234.
- [10] 周春玲, 戴思兰. 菊属部分植物的 AFLP 分析[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(5/6): 71-75.
- [11] 王彩云, 陈俊愉. 菊花及其近缘种的分子进化与系统发育研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(增刊): 91-96.
- [12] 李辛雷, 陈发棣. 菊属野生种、栽培菊花及种间杂种的 RAPD 分析[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 29-33.
- [13] 徐文斌, 郭巧生, 王长林, 等. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 18-21.
- [14] 孙洪, 程静, 詹克慧, 等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 123-127.
- [15] 李宗菊, 熊丽, 桂敏, 等. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 439-444.
- [16] 徐文辉, 高海卿, 陈华进. 菊花某些性状遗传规律的初步探讨[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(1): 37-41.
- [17] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.
- [18] Bruford M W, Cheesman D J, Coote T, et al. Microsatellites and their application to conservation genetics [M] // Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford: Oxford University Press, 1996: 237.
- [19] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 172-177.