

中国不同地理居群鱼腥草遗传多样性分析

黎晓英^{1,2}, 魏 麟¹, 伍贤进^{1*}, 饶力群^{2*}

(1. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008; 2. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:目的 研究中国不同地理居群鱼腥草药材的遗传多样性。方法 选取分布于我国 13 个省市的 15 个不同居群 288 份鱼腥草样本, 进行 AFLP 分析, POPGENE 及 MEGA 软件分析处理数据。结果 通过筛选得到 10 对 AFLP 引物, 扩增得到 110 条带, 其中 70.51% 条带为多态性条带; 有效等位基因数为 1.210, Nei's 多样性指数 H 为 0.119, Shannon 多样性指数 I 为 0.186; 15 个居群遗传距离系数 0.0089 ~ 0.1818; 用 MEGA 软件进行 UPGMA 聚类分析, 15 个居群的鱼腥草材料被分为 3 个大分支。其中峨眉蕺菜最先与其他居群分开, 表明它与其他居群之间的亲缘关系较远。其他 2 个大的分支按地域聚在一起。结论 我国鱼腥草居群间存在较高多态性, 遗传多样性较为丰富。

关键词: 鱼腥草; 居群; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: R282.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)02-0285-04

Analysis on genetic diversity of different geographical populations of *Houttuynia cordata*

LI Xiao-ying^{1,2}, WEI Lin¹, WU Xian-jin¹, RAO Li-qun²

(1. Department of Life Sciences, Huaihua College, Huaihua 418008, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract : Objective To study the genetic diversity of different geographical populations of *Houttuynia cordata* in China. **Methods** The genetic diversity of 15 geographical populations of *H. cordata* from 13 provinces in China was estimated using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. The data of amplified bands were analyzed by the software POPGENE and MEGA. **Results** The ten AFLP primers employed produced a total of 110 discernable and reproduceable amplified fragments. The percentage of polymorphic bands within different populations was 70.51%. Genetic diversity analysis showed that effective number of alleles (N_e) was 1.210, Nei's gene diversity (H) was 0.119, and Shannon's genetic diversity index (I) was 0.186. The coefficient of genetic distance was 0.0089—0.1818 among populations. A UPGMA dendrogram based on Nei's (1972) genetic distance visualized that the 15 populations were grouped into three different clusters, Emei population was one individual cluster group and the other populations were grouped into two different clusters corresponding to the different geographical areas. **Conclusion** The genetic diversity within different geographical populations of *H. cordata* in China is plentiful.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; population; genetic diversity; amplified fragment length polymorphism (AFLP)

鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 是三白草科蕺菜属多年生草本植物, 别名蕺菜、折耳草等, 原产亚洲, 在我国长江流域以南各省均有分布。鱼腥草是传统中药, 具有清热、解毒、利尿、消肿、止血、祛咳、镇痛、抗病毒及提高免疫力等功能^[1~3]; 其嫩叶

及根茎可食用, 受人喜爱。随着药用和食用量的增加, 大量野生鱼腥草被挖掘, 其资源蕴藏量正在渐渐减少。因此, 正确评价野生鱼腥草种质资源遗传多样性, 评估其资源及引种栽培, 并为其有效保护提供重要信息^[4], 十分必要。

* 收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870230); 湖南省自然科学基金资助项目(06JJ50059)

作者简介: 黎晓英(1976—), 女(土家族), 讲师, 研究方向为植物分子生物学 Tel: (0745) 6942908 E-mail: hhlxy@126.com

* 通讯作者 伍贤进 Tel: 13607459358 E-mail: hhxjw@163.com

饶力群 E-mail: raoliqun@163.com

吴卫等^[5]曾对鱼腥草进行了分子标记研究,但由于其种源仅限于四川、重庆,所得结果并不能很好反映鱼腥草资源的某些普遍性特征及信息;彭帅等^[6]运用 ISSR 分析 17 份鱼腥草的亲缘关系,然而每个地方只有 1 份样品,不能代表该地区鱼腥草的遗传多样性;蓝云龙等^[7]利用 RAPD 技术对 23 个来源于全国主产区的 24 个鱼腥草样品进行种质资源遗传多样性分析,但是不同地理位置的样本数过少,也不能很好地反映不同地理居群群体间和居群体内的遗传多样性。本研究应用 AFLP 分子标记技术,对来自中国 13 个省(市、自治区)15 个不同地理居群的 288 份鱼腥草遗传多态性进行分析,将从分子水平比较我国不同地理居群鱼腥草的分子差异,为鱼腥草资源的合理利用与保存及新品种选育提供理论依据,也为鱼腥草药材 DNA 指纹图谱的构建提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料:试验材料采自我国 13 个省(市、自治区)15 个不同地理居群的 288 份个体样本,由于鱼腥草可以进行无性繁殖,为避免研究遗传多样性时受克隆多样性的影响,取样时保证每个样本之间的距离大于 2×10^3 m,并种植保存于怀化学院种质资源圃。样品由中国科学院昆明植物研究所龙春林研究员鉴定为鱼腥草 *H. cordata* Thunb.,其来源见表 1。

表 1 鱼腥草材料来源、居群代码与居群样本数

Table 1 Source, population code, and population sample number of *H. cordata*

居群代码	居群样本数	材料来源
EM	17	四川峨眉山
YA	19	四川雅安
NC	20	重庆南川
ZY	16	陕西紫阳
KM	20	云南昆明黑龙潭
HX	20	贵州贵阳花溪
LC	20	广西陆川
HH	20	湖南怀化
YX	20	湖南攸县
DW	20	湖北大悟
RC	20	江西瑞昌
LX	20	浙江兰溪
LYG	20	江苏连云港
XM	20	福建厦门
CH	16	广东从化

1.2 DNA 提取:每个居群所选取的样本,采摘的新鲜幼嫩叶片 0.3 g 采用 CTAB 法提取 DNA。利用核酸/蛋白定量仪定量。定量后的 DNA 稀释至 30 μ g/mL 以备 PCR 扩增用。

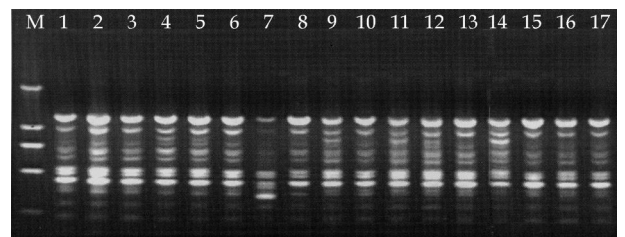
1.3 AFLP 分析:AFLP 分析按照 Vos P 等^[8]的方

法进行,但稍作修改。酶切反应体系加入 1.5 U *EcoR*, 1.5 U *Mse* (上海生工)和 200 ng 基因组 DNA,37 保温 3 h;连接反应体系加入 1.0 U T4-DNA 连接酶、2.0 pmol *Mse* 接头和 2.0 pmol *EcoR* 接头,15 保温过夜;选择性扩增反应体系加入 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶(上海生工),30 ng *Mse* 选择性引物和 30 ng *EcoR* 选择性引物。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。在筛选的 20 对 AFLP 选择性引物中,最终选用了 10 对能产生清晰、多态性高的 DNA 指纹图谱。每对引物的选择性扩增均重复 2 次,以便得到可重复的数据。

1.4 数据分析:AFLP 带为显性标记,按照扩增条带的有无分别记为 1 和 0,只选用在 2 次重复中均出现的带来记分。其结果为一个二元矩阵,将其输入 POPGENE1.32 软件处理分析,计算其多态性位点比率(*PPB*)、有效等位基因数(*Ne*)、*Nei's* 基因多样性指数(*H*)、Shannon 多样性指数(*I*)。采用 MEGA4.1 软件进行 UPGMA 聚类进化分析。

2 结果

2.1 不同居群的遗传多样性分析:本研究筛选的 10 对引物均产生了清晰可辨的指纹图谱,图 1 为其中 1 对引物在一个居群中的扩增结果电泳图。



M-2 kb DNA 相对分子质量标准 1~17-选择性扩增产物

M-2 kb marker 1-17-selected amplification production of AFLP

图 1 AFLP 选择性扩增结果电泳图

Fig 1 Electrophoresis of selected amplification production of AFLP

总共扩增得到 110 条清晰条带,其中 70.51% 呈现多态性。在 110 条条带中,20% 的条带(22)为 50%~100% 样本所共有,45% 的条带(50 条)为 30%~49% 样本所共有,35% 的条带(38 条)为小于 30% 样本所共有;各居群的多态位点变化从 10.90%~52.56%。经 Popgene 软件分析得出:有效等位基因数(*Ne*)为 1.210,*Nei's* 基因多样性指数(*H*)为 0.119,Shannon 多样性指数(*I*)为 0.186;各居群的有效等位基因数、*Nei's* 基因多样性指数和 Shannon 多样性指数变化范围分别为 1.088~1.254、0.049~0.161、0.068~0.250(表 2)。这些

数据表明鱼腥草不同地理居群内遗传多样性较低,各居群间遗传多样性比较丰富。

表 2 所有变异位点的分子进化遗传学分析

Table 2 Genic variation for all loci molecular evolutionary genetics by AFLP analysis

居 群	有效等位 基因数	Nei's 基 因多样性	Shannon's 信息指数	多态位点 百分数/%
四川峨眉 (EM)	1.258	0.161	0.250	52.56
重庆南川 (NC)	1.088	0.048	0.068	10.90
陕西紫阳 (ZY)	1.110	0.059	0.084	13.46
云南昆明 (KM)	1.117	0.063	0.090	14.10
贵州花溪 (HX)	1.168	0.088	0.123	18.59
四川雅安 (YA)	1.155	0.086	0.124	20.51
湖南攸县 (YX)	1.119	0.067	0.098	16.67
江西瑞昌 (RC)	1.105	0.059	0.087	14.74
广西陆川 (LC)	1.126	0.070	0.101	16.67
湖北大悟 (DW)	1.102	0.057	0.084	14.10
浙江兰溪 (LX)	1.094	0.054	0.079	13.46
湖南怀化 (HH)	1.109	0.061	0.089	14.74
江苏连云港 (LYG)	1.095	0.054	0.079	13.46
福建厦门 (XM)	1.097	0.055	0.080	13.46
广东从化 (CH)	1.099	0.056	0.081	14.10
Total	1.228	0.119	0.186	70.51

2.2 不同居群间的遗传相似性和遗传距离:根据 POPGENE1.32 计算的各居群间的遗传相似性和遗传距离,得到的遗传距离为 0.008 9~0.181 8,其中遗传距离最大的来自四川峨眉的蕺菜 EM 和福建厦门的鱼腥草 XM 之间的 0.181 8;最小的是江苏连云港与浙江兰溪的鱼腥草之间,为 0.008 9。各居群的遗传距离和遗传相似性见表 3。

2.3 不同居群间的 UPGMA 聚类分析:运用 MEGA4.1 软件根据各居群的遗传距离构建 UPGMA 树,15 个居群的鱼腥草材料被分为 3 个大分支。其中峨眉蕺菜最先与其他居群分开,表明它与其他居群之间的亲缘关系较远。其他 2 个大的分支大致按地域聚在一起:第 1 支为西南地区的 5 个居群 (KM、HX、YA、ZY、NC),包括云贵高原、四川、重庆等地;第 2 支为中南和东南沿海地区的 9 个居群 (YX、DW、HH、LC、RC、LYG、LX、XM、CH),包括湖南、广西、湖北、江西、江苏、福建、广东等地的鱼腥草(图 2)。

3 讨论

本研究总共扩增得到 110 条清晰条带,其中

表 3 各居群的遗传相似性和遗传距离

Table 3 Nei's genetic similarity and genetic distance of H cordata of different geographical populations in China

居群 ID	EM	NC	ZY	KM	HX	YA	YX	RC	LC	DW	LX	HH	LYG	XM	CH
EM	—	0.904 6	0.890 2	0.877 5	0.869 5	0.846 1	0.853 3	0.849 3	0.840 0	0.845 3	0.836 8	0.844 7	0.845 8	0.833 7	0.838 4
NC	0.100 2	—	0.979 8	0.971 2	0.967 7	0.945 4	0.940 3	0.937 5	0.937 7	0.927 9	0.924 6	0.921 2	0.924 2	0.925 0	0.925 9
ZY	0.116 3	0.020 4	—	0.971 0	0.979 3	0.954 5	0.940 2	0.935 8	0.943 1	0.928 7	0.937 0	0.924 7	0.933 8	0.927 4	0.923 7
KM	0.130 7	0.029 3	0.029 4	—	0.986 5	0.963 2	0.942 7	0.939 9	0.930 6	0.936 9	0.938 3	0.926 7	0.930 6	0.940 5	0.921 2
HX	0.139 8	0.032 8	0.020 9	0.013 5	—	0.984 1	0.952 1	0.947 2	0.949 2	0.939 8	0.940 8	0.937 0	0.934 6	0.939 3	0.938 4
YA	0.167 1	0.056 2	0.046 6	0.037 4	0.016 0	—	0.967 7	0.953 2	0.964 5	0.954 8	0.954 6	0.954 3	0.947 1	0.958 6	0.959 3
YX	0.158 6	0.061 5	0.061 7	0.059 0	0.049 1	0.032 9	—	0.978 7	0.967 6	0.987 3	0.972 4	0.976 8	0.963 9	0.969 9	0.970 6
RC	0.163 3	0.064 5	0.066 4	0.062 0	0.054 2	0.048 0	0.021 6	—	0.953 7	0.965 2	0.966 6	0.955 7	0.957 7	0.955 8	0.952 6
LC	0.174 3	0.064 3	0.058 6	0.071 9	0.052 1	0.036 2	0.032 9	0.047 4	—	0.963 1	0.966 8	0.966 7	0.958 9	0.973 4	0.971 0
DW	0.168 1	0.074 8	0.074 0	0.065 2	0.062 1	0.046 2	0.012 8	0.035 5	0.037 6	—	0.973 5	0.985 9	0.965 7	0.973 1	0.976 0
LX	0.178 2	0.078 4	0.065 1	0.063 7	0.061 0	0.046 4	0.027 9	0.033 9	0.033 7	0.026 8	—	0.959 7	0.991 1	0.980 3	0.961 0
HH	0.168 8	0.082 1	0.078 2	0.076 1	0.065 1	0.046 8	0.023 5	0.045 3	0.033 9	0.014 2	0.041 1	—	0.957 6	0.969 0	0.968 5
LYG	0.167 5	0.078 8	0.068 5	0.072 0	0.067 6	0.054 4	0.036 8	0.043 2	0.042 0	0.034 9	0.008 9	0.043 3	—	0.969 5	0.959 9
XM	0.181 8	0.077 9	0.075 4	0.061 3	0.062 6	0.042 3	0.030 6	0.045 2	0.026 9	0.027 3	0.019 9	0.031 5	0.031 0	—	0.976 1
CH	0.176 2	0.076 9	0.079 3	0.082 1	0.063 6	0.041 6	0.029 9	0.048 6	0.029 4	0.024 3	0.039 8	0.032 1	0.041 0	0.024 2	—

表中右上角为遗传相似性;左下角为遗传距离

Nei's genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

70.51% 呈现多态性。这一结果表明不同居群鱼腥草种质资源多态性水平较高。四川、重庆和云贵高原等地的鱼腥草遗传多样性相对较丰富,与吴卫用 ISSR 分析四川、重庆鱼腥草遗传多样性的结果一致^[5]。通过聚类分析将不同居群鱼腥草分为 3 个不同分支,其分类和鱼腥草的遗传多样性与种源的地理分布存在一定关系,与蓝云龙等^[7]和彭帅等^[6]的结果一致。

鱼腥草居群内遗传多样性较低,居群之间维持着较高的遗传变异,这与其生物学性质是一致的:鱼腥草的生态适应强,在我国分布比较广泛,而广布种往往维持有较高的遗传变异;同时鱼腥草是无融合种宗的子遗,其种宗凭借杂交优势及无融合生殖优势的保持,将蕺菜强大竞争力和广泛适应性等遗传特性保持下来^[9]。另外,鱼腥草可以进行营养繁殖,其突变也是使个体更适应环境,在同样的生境下可

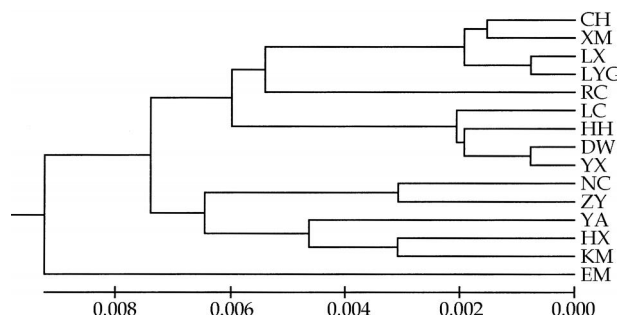


图 2 中国不同地理居群鱼腥草的 UPGMA 树

Fig 2 UPGMA Dendrogram based on Nei's genetic distance of *H. cordata* of different geographical populations in China

能会使居群一致度较高。但是本实验通过远距离采样,没有研究其克隆多样性,也避免了其克隆多样性对本研究结果的影响。同时,地理隔离(包括河流、山脉、冰川以及人为的公路和沟渠)阻碍居群间基因交流,因此对居群遗传结构具有重要的影响,通常导致高的居群分化水平^[10]。鱼腥草分布广泛,常见于山坡、田埂、溪谷旁,所处地理环境异质度高、地理地形复杂,以此来看适应差别以及采样点之间相距较远,基因交流有限也可能是鱼腥草居群间分化的原因之一^[11]。

本研究利用 AFLP 分子标记技术对我国鱼腥草种质资源遗传多样性和遗传结构进行分析,为鱼腥草这一药用植物的引种驯化、遗传育种、繁育栽培

和标准化种植提供理论依据。同时,为建立鱼腥草中药材及其优良品种的 DNA 指纹图谱奠定基础。

参考文献:

- [1] Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T, et al. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 237-241.
- [2] Chiang L C, Chang J S, Chen C C, et al. Anti-herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata* [J]. *Ame J Chin Med*, 2003, 31(3): 355-362.
- [3] 任玉翠,周彦钢,凌文娟,等. 鱼腥草营养液升白细胞作用的研究[J]. 预防医学文献信息,1999,5(1):5-6.
- [4] 姜建国. 鱼腥草的开发利用[J]. 特种经济动植物,2007,10(9):37-38.
- [5] 吴卫,郑有良,陈黎,等. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2003,5(1):70-85.
- [6] 彭帅,伍贤进,罗玥佳,等. 17 份鱼腥草种质亲缘关系的 ISS 分析[J]. 安徽农业科学,2007,35(12):3484-3486.
- [7] 蓝云龙,吴令上,裘波音,等. 鱼腥草 RAPD 分子标记的多态性[J]. 浙江林学院学报,2008,25(3):309-313.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(5): 4407.
- [9] 梁汉兴. 论三白草科的系统演化 and 地理分布 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(3): 255-267.
- [10] Corre V, Dumolir-Lapegus S, Kremer A. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography [J]. *Mol Ecol*, 1997, 6: 519.
- [11] 陈小勇,王希华,宋永昌. 华东地区青冈种群的遗传多样性及遗传分化[J]. 植物学报,1997,39(2):149.

秋水仙素诱导茴香多倍体的研究

任安祥,潘春香*,何金明,张振明,肖艳辉,林舒

(韶关学院英东生物工程学院,广东 韶关 512005)

摘要:目的 探讨不同秋水仙素浓度和不同处理时间诱导茴香多倍体的效果。方法 采用种子浸泡法以不同秋水仙素浓度、不同处理时间诱导下的种子的萌发率和诱变率、胚根诱变体的外部形态、染色体数量、内部组织构造以及精油量和成分进行了比较。结果 诱导液质量浓度为 0.13%,处理时间为 24 h 时的诱导效果最好;诱导后的突变体胚根与对照相比,表现粗大、染色体数目明显增加、胚根的内部细胞数量明显增多、4 种主要精油成分中除蒎烯、柠檬烯略低于对照外,柠檬醛、反式-茴香脑和蒾烯 3 种成分均显著提高。结论 秋水仙素诱导的突变体可以较大幅度地提高茴香主要精油成分的量,为茴香高精油量多倍体新品种的培育提供了依据。

关键词:茴香;多倍体;秋水仙素;诱导

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0288-04

* 收稿日期:2009-05-12

基金项目:国家自然科学基金(31370151);内蒙古自然科学基金(2009MS0311);内蒙古自治区人才开发基金(No2009-12)

作者简介:任安祥(1960—),男,内蒙古呼和浩特市人,教授,长期从事园艺植物栽培与生理方面的研究。

E-mail:renanxiang@163.com

*通讯作者 潘春香 Tel:(0751)8124909 E-mail:pcx992@yahoo.com.cn