

对叶百部遗传多样性的 ISSR 分析

王晓彤¹, 罗 点¹, 陈 高², 王孝勋^{1*}, 吴思宇¹, 杨丹丹¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530002

2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204

摘 要: **目的** 分析不同居群对叶百部 *Stemona tuberosa* 的亲缘关系和遗传多样性。**方法** 应用 ISSR 分子标记技术研究长江流域以南各省对叶百部的遗传多样性; 采用 POPGENE32 进行亲缘关系分析, NTSYSpc-2.10E 进行 UPGMA 聚类分析。**结果** 7 条 ISSR 引物共检测到 74 个清晰的扩增位点, 多态性位点 74 个, 多态性位点百分率 100%; 有效等位基因数 (N_e) 为 1.524 4, 平均 Nei's 基因多样性指数 (H_e) 为 0.314 6, 平均 Shannon 多样性指数 (I) 为 0.478 6, 各居群间的遗传距离介于 0~0.950 2, 平均值为 0.416 3。**结论** 从分子角度揭示了对叶百部具有较高的遗传多样性, 其居群间亲缘关系与地理环境有一定的相关性, 实验结果将为后续对叶百部引种栽培及根用药植物资源的持续利用, 特异生物碱的筛选及其运用于化学分类, 以及对叶百部道地药材产区的科学选择奠定理论基础。

关键词: 对叶百部; ISSR; 分子标记; 遗传多样性; 药用植物

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)19-4051-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.023

ISSR analysis on genetic diversity of traditional medicinal plant *Stemona tuberosa*

WANG Xiao-tong¹, LUO Dian¹, CHEN Gao², WANG Xiao-xun¹, WU Si-yu¹, YANG Dan-dan¹

1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530002, China

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China

Abstract: **Objective** To analyze the relationship and genetic diversity of *Stemona tuberosa* in different populations. **Methods** ISSR molecular technique was used to decipher the genetic diversity of *S. tuberosa* in South of the Yangtze River. The genetic relationships among different populations were analyzed based on software POPGEN32 and the DNA molecular dendrogram was structured according to the software NTSYSpc-2.10E. **Results** Seventy-four obvious bands of different *S. tuberosa* populations were amplified with seven suitable ISSR primers, 74 of them were polymorphic sites, and the percentage of polymorphism bands reached to 100%; Effective number of alleles (N_e) is 1.524 4, the average Nei's genetic diversity (H_e) index is 0.314 6, the average Shannon's information index is 0.478 6, the genetic distance among populations is 0—0.950 2, and the average distance is 0.416 3. **Conclusion** The study revealed that a relative high genetic diversity occurred in different populations of *S. tuberosa*, the genetic variation is related to geographical distance in different populations of *S. tuberosa*. The study will throw light on how to introduce and cultivate traditional Chinese medicinal plant, how to screen peculiar pyrrolidine alkaloids from *S. tuberosa*, and how to build to scientific standards and theoretical basis for traditional geo-authentic crude drug in China.

Key words: *Stemona tuberosa* Lour; ISSR; molecular marker; genetic diversity; medicinal plant

对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour 为百部科百部属植物, 其药用部位为块根, 具有润肺下气止咳、杀虫灭虱的功效, 用于新久咳嗽、肺癆咳嗽、顿咳, 外用于头虱、体虱、蛲虫病^[1], 是我国的传统中药,

此外对叶百部也是东南亚各国的传统药用植物。对叶百部在中国主要分布于长江流域以南各省^[2], 基本野生, 偶见栽培^[3]。近年来对叶百部的资源遭到过度开发, 其生境也受到不同程度的破坏, 以致在

收稿日期: 2017-05-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360640, 31670322); 广西自然科学基金项目 (2016GXNSFAA380072); 广西中医药大学研究生创新课题 (YJS2016027); 广西壮瑶药重点实验室项目 (桂科基字 [2014] 32 号); 壮瑶药协同创新中心项目 (桂教科研 [2013] 20 号)

作者简介: 王晓彤 (1990—), 女, 回族, 广西中医药大学硕士研究生, 研究方向为中药品种、品质及资源开发研究。

Tel: 15678911576 E-mail: 342680844@qq.com

***通信作者** 王孝勋 (1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药品种、品质及资源开发研究。

Tel: (0771)3941063 E-mail: 407977122@qq.com

野外寻找到大的自然居群(植株数在 40 m×40 m 的样方内可以超过 10 株)变得越来越难。本课题组在野外进行实地调查、采集引种对叶百部的不同产地资源时,发现根据以前的标本记录已经难觅对叶百部的踪迹。在所调查的几十个居群中,仅发现在风水林、坟场等地的自然居群保存较好。考虑到对叶百部为根用药的植物,被挖掘后容易导致区域性灭绝,这种看起来分布极广,但孤立居群均受到严重威胁的传统药用植物的资源可持续利用及保护值得政府部门及科研工作者密切关注。

目前对于百部属的研究集中在化学成分和药理作用及传粉生物学方面^[4-5],在分子领域,有少数学者进行研究,如 Vongsak 等^[6]应用 DNA 条码技术对对叶百部及几种混伪品进行真伪鉴定; Fan 等^[7]测定了百部属 5 个种叶绿体 DNA 中 trnL-trnF、trnH-psbA、petB-petD 和 trnK-rps16 4 个区域的序列和单元型,证明百部遗传变异与地理分布紧密相关。付晨熙等^[8]用 ISSR 对直立百部居群的遗传多样性进行过分析,结果支持将山东百部作为直立百部的异名, Mental 检测显示居群间遗传距离与地理距离间没有显著相关性。近期基于 AFLP 分子标记技术对海南和广东产细花百部的遗传分析中发现不同居群也没有明显的地理分化趋势,研究者认为河流的长距离传播可能影响细花百部的遗传分化。但作为分布最广、使用量最大的对叶百部的居群,遗传学却没有得到详细研究,其原因可能是因为该种在亚洲 11 个国家有分布,很难系统采集不同产地的代表性居群。本研究系统采集中国产对叶百部居群(11 省)及其亲缘种(蔓生百部、直立百部、细花百部),采用具有重复性好、稳定性高,多态性丰富等优点的 ISSR 分子标记技术(近年来该技术已大量应用于药用植物的遗传与育种分析中),分析该物种的遗传变异,同时解析国产百部属不同物种的亲缘关系,以期后续引种栽培及根用药植物资源的持续利用,对叶百部特异生物碱的筛选及其运用于化学分类,以及道地药材产区的科学选择提供理论基础及技术指导。此外,研究发现不同产地的对叶百部生物碱量及种类也存在比较明显的差异^[9-10]。考虑到次生代谢产物的调节过程和遗传因素密切相关,也希望本研究能结合形态学特征,特别是花特征的变化,对叶百部是否是一个分类学上的“自然好种”进行

考察。

1 药材、仪器与试剂

1.1 药材

样品于 2015 年 10~12 月采自广西、广东、福建、湖北等省,其种名、编号、采集地点见表 1。结合《中国植物志》中文版的描述和物种记录,所有实验药材均经广西中医药大学中药鉴定教研室王孝勋副教授鉴定为对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour、蔓生百部 *S. japonica* (Bl.) Miq、直立百部 *S. sessilifolia* (Miq.) Miq、细花百部 *S. parviflora* C. H. Wright。

1.2 仪器与试剂

医用离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; BIO-RAD T100™ PCR 仪、BIO-RAD PowerPac™ 通用电泳仪电源、Gel Doc™ XR⁺With Image Lab™ software,美国 Bio-Rad 公司。2xEs Taq Master Mix,北京康为世纪生物科技有限公司; ISSR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

每个样品采集自不同居群的 1 个植株,取适量硅胶干燥、无虫孔及霉菌感染的叶片,经液氮冷冻研磨后,用新型植物基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 DNA,然后将样品 DNA 放置于-20℃冰箱保存待用。

2.2 引物的筛选

根据加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的引物序列,在 100 条中筛选出扩增条带清晰、多态性较好的引物用于对叶百部及其近缘种的遗传多样性分析。

2.3 PCR 扩增及检测

2.3.1 ISSR-PCR 反应体系 2xEs Taq Master Mix 10 μL; 引物 1 μL (0.4 μmol/L); DNA 模板 1 μL; ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序根据朱华等^[11]所设稍加修改: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 55 s; 退火 1 min (每个引物有最适的退火温度); 72℃延伸 2 min; 30 个循环; 72℃再延伸 10 min; 4℃保存。

2.3.2 电泳检测 将扩增产物用 1.2%的琼脂糖电泳检测,上样量为 7 μL,电压 75 V,电泳 40 min,凝胶成像系统拍照,保存。

2.4 数据统计及分析

ISSR 为显性标记,同一种引物的扩增产物在电泳中迁移速率一致的条带具有同源性,按照相同位

表 1 供试药材来源信息

Table 1 Detail information of plant material

编号	种名	采集地	经纬度	海拔/m
1	对叶百部	广西河池天峨县	E107°11'40" N24°51'06"	580
2	对叶百部	广西河池南丹县	E107°27'57" N24°49'35"	510
3	对叶百部	广西河池凤山县	E106°59'51" N24°32'37"	570
4	对叶百部	广西桂林恭城瑶族自治县	E110°50'42" N24°47'24"	160
5	对叶百部	广西桂林平乐县	E110°49'51" N24°43'30"	180
6	对叶百部	广西崇左龙州县	E106°56'10" N22°15'30"	205
7	对叶百部	广西崇左大新县	E106°57'55" N22°37'44"	279
8	对叶百部	广西防城港东兴市	E107°59'30" N21°36'28"	30
9	对叶百部	广西防城港防城区	E108°12'11" N21°46'55"	72
10	对叶百部	广东韶关乳源瑶族自治县	E113°24'09" N24°48'08"	134
11	对叶百部	广东韶关乐昌市	E113°28'10" N25°10'18"	141
12	对叶百部	福建三明将乐县	E117°27'13" N26°43'07"	264
13	对叶百部	福建南平顺昌县	E117°53'13" N27°04'37"	239
14	对叶百部	江西吉安永丰县	E115°51'16" N26°56'37"	530
15	对叶百部	江西赣州宁都县	E115°55'21" N26°49'48"	610
16	对叶百部	湖北宜昌点军区	E111°14'29" N30°44'11"	127
17	对叶百部	湖北宜昌宜都市	E111°18'59" N30°21'19"	139
18	对叶百部	湖南永州道县	E111°35'42" N25°39'15"	180
19	对叶百部	湖南永州江华瑶族自治县	E111°35'30" N25°03'49"	350
20	对叶百部	湖南永州江永县	E111°31'32" N25°14'46"	370
21	对叶百部	云南文山西畴县	E104°31'12" N23°13'24"	1 310
22	对叶百部	贵州安顺西秀区	E105°52'05" N26°05'45"	550
23	对叶百部	贵州安顺关岭布依族苗族自治县	E105°41'28" N25°45'15"	1 100
24	对叶百部	四川达州万源市	E108°20'43" N32°08'01"	160
25	对叶百部	四川巴中通江县	E107°26'48" N32°15'21"	370
26	对叶百部	重庆巫溪县	E109°47'48" N31°24'49"	700
27	对叶百部	重庆奉节县	E109°15'20" N30°49'22"	820
28	对叶百部	海南陵水黎族自治县	E109°92'23" N18°66'73"	38
29	对叶百部	海南白沙黎族自治县	E109°40'33" N19°20'55"	228
30	蔓生百部	浙江湖州安吉县	E119°32'20" N30°46'39"	450
31	直立百部	山东莱芜莱城区	E117°43'27" N36°14'35"	560
32	细花百部	海南白沙黎族自治县	E109°40'71" N19°06'04"	309
33	细花百部	海南澄迈县	E109°85'23" N19°57'47"	110
34	细花百部	海南陵水黎族自治县	E109°92'21" N18°66'72"	99

置上有条带计数,有清晰条带的被赋值为“1”,没有条带或者不清晰的被赋值为“0”,形成 0/1 矩阵。应用 POPGENE32 软件计算有效等位基因数

(N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H_e)、Shannon 多样性指数 (I)。Ntsys-pc2.10E 软件采用 UPGMA 法进行聚类分析,构建聚类图。

3 结果与分析

3.1 引物筛选结果

在 100 条引物中筛选出 7 条能够扩增出清晰、多态性良好条带的引物, 分别是 UBC812、UBC815、UBC826、UBC835、UBC836、UBC853、UBC856, 总共扩增出 74 条条带, 其中多态性条带 74 条, 多态性比率达到 100%。详细信息见表 2, 引物 UBC853 对 34 个样品的扩增见图 1。

表 2 不同引物的扩增结果

Table 2 Amplified results of different primers

引物	核苷酸序列 (5'-3')	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率/%
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	10	10	100
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG	12	12	100
UBC826	ACACACACACACACACC	10	10	100
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	13	13	100
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	10	10	100
UBC853	TCTCTCTCTCTCTCRT	11	11	100
UBC856	ACACACACACACACACYA	8	8	100

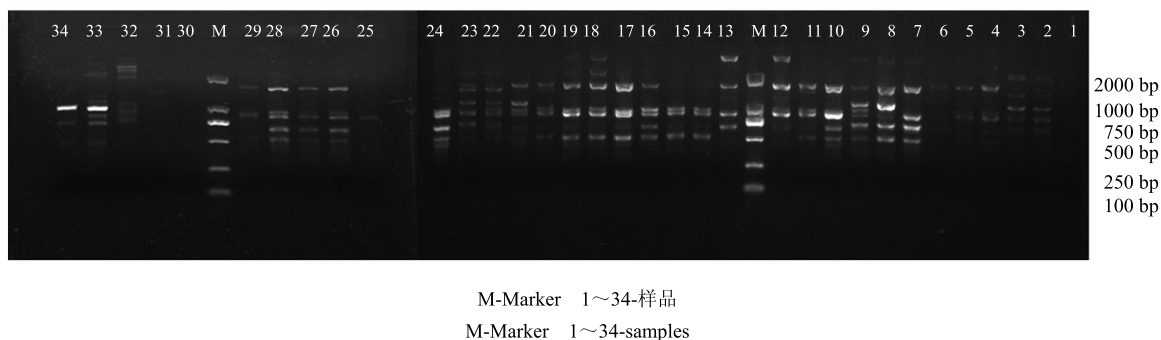


图 1 引物 UBC853 对 34 个样品的扩增

Fig. 1 Electrophoresis of primer UBC853 tested in 34 samples

3.2 遗传多样性参数分析

使用 POPGENE32 软件分析不同居群对叶百部的遗传多样性、各居群间的遗传距离, 结果表明, N_e 为 1.524 4, I 为 0.478 6, H_e 为 0.314 6, 各居群间的遗传距离为 0~0.950 2, 平均遗传距离 0.416 3, 蔓生百部、直立百部和对叶百部的遗传距离较大, 遗传一致性与遗传距离相反, 遗传距离小的 2 个居群遗传一致性高。

3.3 聚类分析

根据 74 条条带建立的遗传相似度矩阵, 按 UPGMA 法进行聚类分析, 构建基于 SM 遗传相似系数的 34 份样品聚类分析图 (图 2)。由图 2 可见, 在相似系数为 0.610 时, 作为外类群的蔓生百部、直立百部、细花百部与对叶百部分开, 在相似系数为 0.635 时, 可将剩余的对叶百部居群分为 2 类, 广西河池、贵州、云南 (编号 1、2、3、21、22、23) 首先与其他居群分开。在相似系数为 0.685 时, 又可将剩余的居群分为 3 类, 第 1 类包括广西崇左、广西防城港、海南陵水县 (编号 6、7、8、9、28), 第 2 类包括福建省的 2 个居群 (编号 12 和 13), 第 3 类包括剩余的其他类群, 其中四川、重庆聚为一支 (编号 24~27); 海南白沙聚为一支 (编号 29); 更细分后发现江西、湖南、湖北能聚为一支 (编号 14~20); 广西广东的部分居群聚为一支 (编号 4、5、10、11)。

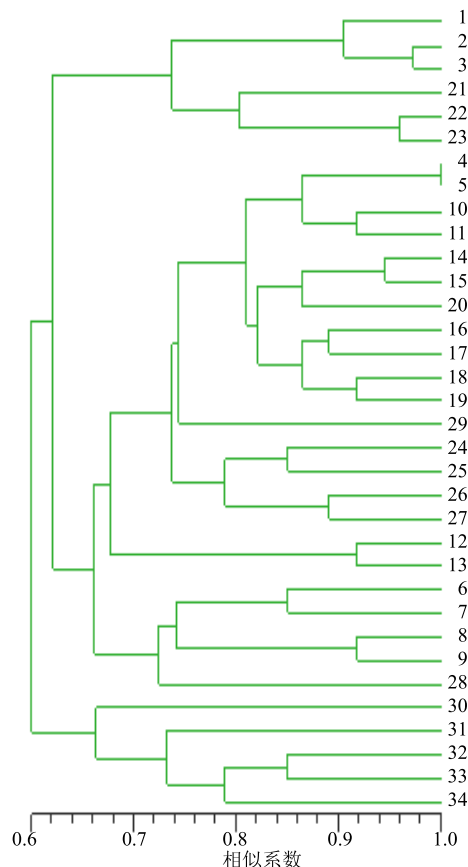


图 2 UPGMA 聚类分析图

Fig. 2 UPGMA clustering map

4 讨论

DNA 分子标记技术是在形态标记、细胞标记以及生化标记后的一种新型的遗传标记方法^[12], 如今已经大量应用于药用植物亲缘关系的探究当中。本实验采用 ISSR 分子标记方法, 其扩增的多态性比率达到 100%, 说明本方法适用于对叶百部及其近缘种的遗传多样性研究。所检测到的 74 个位点 N_e 为 1.524 4, I 为 0.478 6, H_e 为 0.314 6, 说明对叶百部遗传多样性水平较高。聚类分析可见, 蔓生百部、直立百部、细花百部与对叶百部可以完全分开, 亲缘关系较远, 与付晨熙等^[8]的研究结果吻合; 不同居群的对叶百部也存在差异, 广西河池和贵州、云南的样品首先聚为一类, 可能是因为位置接近, 所处环境相似, 遗传变异较小。广西崇左和防城港地区地处边境, 与越南接壤, 也单独聚为一大类, 但该分支中也出现海南陵水黎族自治县的居群, 在地理位置上比较远, 可能涉及到对叶百部中部分居群存在的杂交或基因渗透现象。福建三明和南坪居群也聚为一支, 但这一支的花其实存在较大的变异, 它们可能为隐种或地理变异大的生态型。四川达州、巴中和重庆地区的种类本课题组在野外见到过开放的花, 特征稳定。海南白沙黎族自治县对叶百部的花特征和大陆上的有些差异, 可能是由于该居群在海南岛进行长期的隔离分化有关。位于江西、湖北和湖南的对叶百部居群 (编号为 14~20), 本课题组在野外也采集过花期和果期的植株, 是一群稳定进化的类群, 唯一的不同点是这类居群花的气味呈现典型的尸体腐烂气味 (二甲基二硫、二甲基三硫类次生代谢产物), 而非其他对叶百部居群呈现典型的粪臭气味 (粪臭素、吲哚、苯酚、对甲基苯酚类化合物), 这些差异的遗传学基础值得进行下一步的研究。

对叶百部是百部科百部属中分布最为广泛的物种, 而该属其他物种均为狭窄地理分布种。之前的研究揭示百部科的种子传播主要是由蚂蚁传播完成, 因蚂蚁的全球平均传播距离不超过 3 m^[13], 所以不同百部属植物呈现地区特有种是可以解释的。但最近的研究发现对叶百部的种子可能由蚂蚁和胡蜂共同传播完成^[14], 考虑到胡蜂传播的距离可以达到 500 m 或更远^[15], 该物种的广泛分布格局也是容易理解的。由于对叶百部在亚洲的分布范围超过 10 个国家, 所以只有在系统采集该物种代表性居群的材料后, 才能更好地解析该物种的分布格局及其成因。但有一点是可以明确的, 广泛的分

布、经纬度跨越、不同的生态位置适应性、变化的种子传播模式应该会显著影响该物种的表型变异及其遗传结构。

对叶百部是一个表型变化非常丰富的物种, Ji 等^[16]在编撰《中国植物志》英文版百部科的检索表时, 认为中国仅存在 7 个自然物种, 但本课题组近 8 年的野外调查发现, 对叶百部可能是一个复合群, 里面应该包含一些新组合甚至是新种。本研究的结果表明, 虽然广西龙州和广西防城港距离较近, 但它们的花特征却差异显著, 这些居群的植物化学成分分析也揭示它们应该是可以被处理为不同的分类群。因为当年受经费限制的制约, 吉占和多数情况下是根据查看标本编撰的植物志, 但百部属在世界范围内分类的特征主要是依据花药及其附属物、药隔及其附属物、花被特征的颜色等进行的, 然而这些特征制成标本后往往容易丢失, 所以系统的采集新鲜材料, 比较不同代表居群的特征及其变化幅度才能更好地理清对叶百部的综合修订问题。

虽然本研究只采集了中国的对叶百部居群, 但考虑到该物种作为中国传统的药用植物, 目前的研究已经是对该物种较为详尽的系统采集及其遗传多样性分析。所得到的结果有助于阐述该物种在中国自然分布范围的形态变异和遗传差异。下一步本课题组将具体分析对叶百部不同居群及其近缘种的百部生物碱多样性, 探究生育酚类成分在不同百部类群中的分布和分化情况。以期后续引种栽培及根用药植物资源的持续利用, 对叶百部特异生物碱的筛选及其运用于化学分类, 以及该物种道地药材产区的科学选择提供理论基础和技术指导。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡若瑛. 百部的植物来源及本草考证 [J]. 四川中医, 1986(12): 31-32.
- [3] 朱 华, 郭晓恒, 王孝勋, 等. 广西产百部的资源与生境调查 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2638-2639.
- [4] Chen G, Jüergens A, Shao L D, et al. Semen-like floral scents and pollination biology of a sapromyophilous plant *Stemona japonica* (Stemonaceae) [J]. *J Chem Ecol*, 2015, 41(3): 244-252.
- [5] 魏艺聪, 袁 媛, 陈建雄, 等. 快速 PCR 法鉴别鱼腥草与百部还魂的方法研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2163-2166.
- [6] Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, et al. Sequencing analysis of the medicinal plant *stemona tuberosa* and five

- related species existing in Thailand based on trnH-psbA chloroplast DNA [J]. *Bioch Mol Biol*, 2008, 74(14): 1764-1766.
- [7] Fan L L, Zhu S, Chen H B, *et al*. Molecular analysis of stemona plants in China based on sequences of four chloroplast DNA regions [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(8): 1439-1446.
- [8] 付晨熙, 方 明, 朱友林, 等. 直立百部遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1553-1559.
- [9] 李耀华, 陈广钜, 王孝勋, 等. 广西不同产地对叶百部总生物碱的含量测定 [J]. 广西中医药, 2013, 36(4): 78-80.
- [10] 王 昶, 陈丽艳, 张树明, 等. 不同产地对叶百部中新对叶百部碱含量比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10): 2295-2296.
- [11] 朱 华, 周雨晴, 杜沛霖, 等. 对叶百部基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 体系优化 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 209-211.
- [12] 温海霞, 蔡家利, 邹姝姝. DNA 分子标记在药用植物中的应用 [J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(2): 153-156.
- [13] Gómez C, Espadaler X. An update of the world survey of myrmecochorous dispersal distances [J]. *Ecography*, 2013, 36: 1193-1201.
- [14] Chen G, Huang S Z, Chen S C, *et al*. Chemical composition of diaspores of the myrmecochorous plant *Stemona tuberosa* Lour. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2016, 64: 31-37.
- [15] Li T S. *Economic insect fauna of China: Hymenoptera, Vespoidea* [M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [16] Ji Z H, Duyfjes B E E. *Flora of China* (Volume 24) [M]. Bei jing: Missouri Botanical Garden Press, 2000.