

• 药材与资源 •

云南桃儿七遗传多样性的 DALP 分析

吴 刚^{1,2}, 虞 泓², 崔光芬^{2*}(1 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南 万宁 571533; 2 云南大学生命科学学院
生态遗传学实验室, 云南 昆明 650091)

摘 要:目的 进行药用植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* 的遗传多样性研究, 为桃儿七资源的保护和开发利用提供分子遗传理论基础。方法 对 6 个桃儿七居群进行 DALP 分析, 利用 PopGene 1.31 软件分析遗传多样性相关数据, UPGMA 方法聚类, 结合 Treeview 软件生成树状图。结果 筛选 5 对引物组合, 扩增共产生 150 条 DNA 片段, 其中 104 条谱带具有遗传多态性, 占 69.33%, 平均每组引物扩增所得多态条带为 20.8, 6 个居群平均多态百分率为 14.22%。6 居群总的观察等位基因数 N_a 为 1.693 3, 平均 1.142 2; 总的有效等位基因数 N_e 为 1.417 1, 平均 1.083 8; 基因多样性指数 H 为 0.244 3, 平均 0.048 8; 总的 Shannon 多样性指数 I 为 0.364 3, 平均 0.073 0; 居群总的基因多样性 H_t 为 0.244 3, 居群内基因多样性 H_s 为 0.048 7。基因分化系数 G_{st} 为 0.800 5, 即遗传变异有 80.05% 发生在居群间, 19.95% 发生在居群内, 居群每代迁移数 N_m 为 0.124 6。结论 桃儿七居群间存在较大的遗传分化, 基因流受到阻碍, 这与桃儿七的繁育系统和生存环境紧密相关。

关键词: 桃儿七; DALP; 遗传多样性

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0951-05

DALP Analysis on genetic diversity of *Sinopodophyllum hexandrum* in Yunnan ProvinceWU Gang^{1,2}, YU Hong², CUI Guang-fen²

(1 Spice and Beverage Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Wanning 571533, China; 2 Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Objective To study the genetic diversity of *Sinopodophyllum hexandrum* so as to provide basic molecular genetic evidence for protecting and exploiting the resource of *S. hexandrum*. **Methods** Six populations of *S. hexandrum* were analyzed by DALP molecular markers. To make up the genetic diversity correlation data by PopGene 1.31 software and cluster by UPGMA method, and establish the dendrogram. The tree was subsequently visualized with Treeview software. **Results** Five primer groups were screened and a total of 150 DNA fragments were amplified, among which 104 were polymorphic, i.e. the percentage of polymorphic bands (PPB) was 69.33%, the average number of DNA polymorphic band amplified by each primer group was 20.8 and the average PPB was 14.22%. In the six populations, the total observed number of alleles (N_a) was 1.693 3 and the average N_a was 1.142 2; The total effective number of alleles (N_e) was 1.417 1 and the average N_e was 1.083 8; The total Nei's gene diversity (H) was 0.244 3 and the average H was 0.048 8; The total Shannon's information index (I) was 0.364 3 and the average I was 0.073 0; The total gene diversity (H_t) was 0.244 3 while the gene diversity within a population (H_s) was 0.048 7. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.800 5 between populations, namely 80.05% genetic variation occurring between populations and the rest 19.95% within population, and estimated gene flow (N_m) was 0.124 6. **Conclusion** The result indicates that *S. hexandrum* has much larger genetic differentiation among populations and gene flow has been blocked. This might be a result of species breeding system and population habitat.

Key words: *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; DALP; genetic diversity

* 收稿日期: 2008-08-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370156); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21009-5-09)

作者简介: 吴 刚(1981—), 男, 硕士, 主要从事植物生态遗传的研究, 发表相关论文 2 篇。

Tel: 13876664969 E-mail: wugang0225@sina.com

桃儿七 *Sinopodophyllum hex andrum* (Royle) Ying 是小檗科鬼臼亚科桃儿七属多年生草本植物, 分布于喜马拉雅及邻近地区, 产于云南、四川、西藏、甘肃、青海和陕西, 生于林下、林缘湿地、灌丛中或草丛中, 海拔 2 200~ 4 300 m。在国外, 主要分布于不丹、尼泊尔、印度北部、巴基斯坦、阿富汗及克什米尔^[1, 2]。根茎、须根、果实均可入药, 根茎能除风湿、利气血、通筋、止咳; 果能生津理气、止咳化痰、麻木、月经不调等症均有疗效^[3]。且根和根茎中含有的鬼臼毒素是合成多种抗癌药物的前体, 是一种民间草药, 为我国的珍稀药用植物, 属国家三级保护物种, 被列入《中国珍稀濒危植物名录》和《中国植物红皮书》^[4]。DALP(direct amplification of length polymorphisms, 直接扩增片段长度多态性) 是 1998 年

由法国科学家 Desmarais 发展起来的一种检测 DNA 多态性的方法。它是通过 AP-PCR 方法扩增出不同长度 DNA 片段以检测 DNA 多态性的一种分子标记技术^[5]。本实验对分布于云南滇西北的 6 个桃儿七居群进行了 DALP 检测, 对其居群遗传多样性和遗传结构进行分析, 为桃儿七的引种驯化、遗传育种、繁殖栽培和规模化种植提供有用基础理论。

1 材料和方法

1. 1 植物材料: 本研究以桃儿七 6 个居群为主要研究对象, 同时选取川八角莲 *Dysosma veitchii* (Hemsl et Wils) Fu 1 个居群为外类群, 均引种种植于云南昆明英茂生物技术实验室保育基地, 所用实验材料由云南大学生命科学学院虞泓教授鉴定, 见表 1。

表 1 实验材料

Table 1 Materials in this study

物 种	居群产地	生 境	海拔/ m	备 注
桃儿七 <i>S. hexandrum</i>	云南小中甸唐木纳村(tm)	灌木丛下, 林下*	2 100*	种子苗
	云南小中甸民各村(mg)	田间空地*	2 100*	种子苗
	云南中甸石卡山(tt)	杜鹃、高山栎灌丛中	3 400	野生引种
	云南小中甸南比次(zz)	田间空地*	2 100*	种子苗
	云南中甸丫口(yy)	灌木丛下, 沟边	3 300	野生引种
	云南中甸碧塔海(bb)	田间空地*	2 100*	种子苗
川八角莲 <i>D. veitchii</i>	云南嵩明阿子营乡(cc)	林下*	2 100*	野生引种

* 为引种地(云南英茂生物技术实验室保育基地) 的生境和海拔

* Habitat and altitude of introduction place (Inmol Laboratory of Biotechnology of Yun nan)

1. 2 方法

1. 2. 1 总 DNA 的提取: 基因组 DNA 提取采用 CTAB 法。每株取 0. 5 g 新鲜的叶片, 提取的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测、λDNA 标定, 利用 Kodak Image Station 440CF 凝胶成像分析系统分析并标定到 20 ng/μL 备用。

1. 2. 2 PCR 扩增: 从 6 个居群中各取出 2 份 DNA 样品进行预实验, 选出 5 组能获得清晰条带的引物组合: PR₂-P221; RP₂-P222; PR₂-P235; PR₂-237; PR₂-P241, 引物组序号与序列见表 2。

表 2 DALP 引物组序号与序列

Table 2 Sequences of DALP primer groups used

引 物	引物号	序列(5'~ 3')
选择性引物	DALP 221(P221)	GTTTTCCAGTCACGACGC
	DALP 222(P222)	GTTTTCCAGTCACGACGT
	DALP 235(P235)	GTTTTCCAGTCACGACAC
	DALP 237(P237)	GTTTTCCAGTCACGACAGA
	DALP 241(P241)	GTTTTCCAGTCACGACATCA G
反向引物	DALP _{R2} (PR ₂)	AACA GCTATGACCATGA

反应体系: 采用 20 μL 反应体系, 其中模板 DNA 60 ng, 2 μL 25 mmol/ L MgCl₂(*Taq* 酶配套), 2 μL 10× Buffer(*Taq* 酶配套), 1 μL 2. 5 mmol/ L

dNTPs(上海生工分装), 4 μL 0. 5 U/μL *Taq* 酶(Shanghai Promega), 1 μL 5 pmol/ L 选择性引物(上海生工合成), 3 μL 5 pmol/ L 反向引物(上海生工合成), 引物序列见表 2。本研究采用反向引物 PR₂ 分别与 5 个选择性引物组合进行 DALP 扩增。

扩增程序: 使用 PE9700 扩增仪(美国 PE 公司)。95 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 50 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 35 个循环。最后, 72 ℃延伸 10 min 完成整个 PCR 扩增。

产物检测: 扩增产物在 1× TBE, 1. 0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, Kodak 凝胶成像系统照像, 检测 DALP 带型, 后再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染。

1. 2. 3 聚丙烯酰胺电泳: 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺比例为 29: 1), 上样量 5 μL(样品与 6× 上样缓冲液比例为 5: 1)。电泳条件: Bio- Rad 垂直电泳仪(美国 Bio- Rad 公司) 800 V、150 min。

1. 2. 4 DALP 银染: 采用快速银染法, 参照王海英的方法^[6]。

1.2.5 数据处理: 根据 DALP 指纹图谱(图 1) 中 Mark 的相对分子质量标准估计扩增条带的相对分子质量, 每个样品的扩增带按有或无记录, “有” 赋值为 1, “无” 赋值为 0, 得到原始数据表征矩阵, 弱带及重复性不好的条带不予统计。利用 PopGene 1.31 软件计算各居群的多态位点百分率(PPB)、Shannon 多样性指数(I)、观察等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、总基因多样性(H_t)、居群内基因多样性(H_s) 和居群间基因分化系数(G_{st}) 等相关指标, 并进行 UPGMA 聚类分析, 结合 Treeview 软件生成树状图。

2 结果

2.1 遗传多样性: 桃儿七 6 个居群, 5 组 DALP 引物扩增得到 150 条清晰条带, 部分 DALP 指纹示意图见图 1, 平均每组引物扩增条带数为 30, 其中 104 条为多态条带, 平均每组引物扩增所得多态条带为 20.8。6 个居群的平均多态条带比率、总的多态条带比率、各居群 PPB 值、总的观察等位基因数 N_a 、平均 N_a 、总的有效等位基因数 N_e 、平均 N_e 、Nei's 基因多样性指数 H 、平均 H 、总的 Shannon 多样性指数 I 、平均 I 等, 见表 3。

2.2 遗传分化及聚类分析: 计算得桃儿七总的基

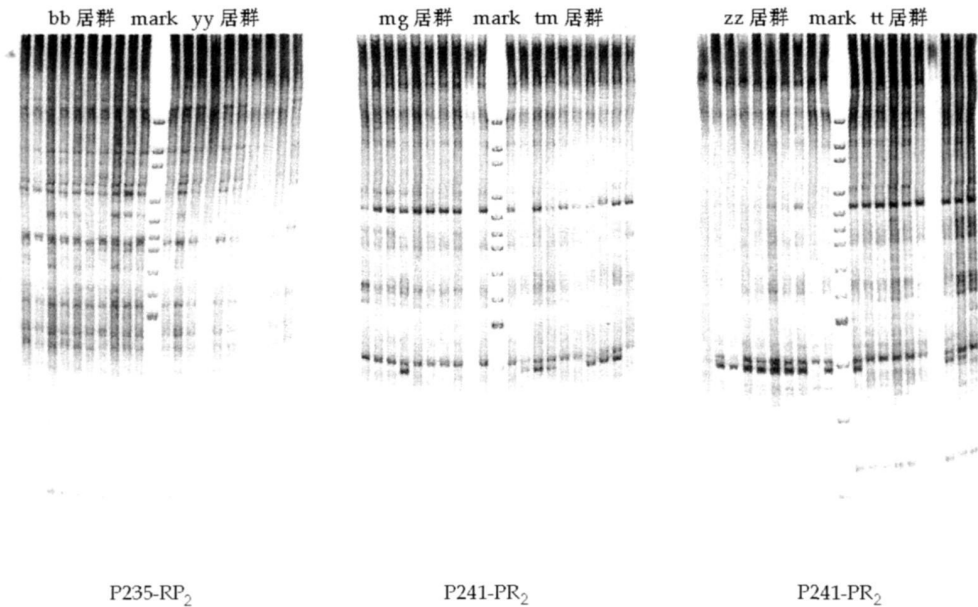


图 1 桃儿七 DALP 指纹图谱示意图

Fig 1 DNA Fingerprints of DALP from *S. hexandrum*

表 3 桃儿七居群 DALP 遗传多样性

Table 3 Analysis of DALP genetic diversity in populations of *S. hexandrum*

物种	居群	样本数	多态条带	多态条带比率/%	N_a	N_e	H	I
桃儿七	tm	10	18	12.00	1.1200	1.0673	0.0396	0.0598
	mg	10	25	16.67	1.1667	1.1108	0.0635	0.0935
	tt	10	30	20.00	1.2000	1.1157	0.0676	0.1014
	zz	10	15	10.00	1.1000	1.0545	0.0327	0.0497
	yy	10	24	16.00	1.1600	1.1196	0.0655	0.0946
	bb	10	16	10.67	1.1067	1.0351	0.0236	0.0390
均值		10	21.33	14.22	1.1422	1.0838	0.0488	0.0730
总计		60	104	69.33	1.6933	1.4171	0.2443	0.3643
川八角莲	cc	5	19	12.67	1.1267	1.0860	0.0496	0.0730

居群产地见表 1

Population habitat seen in Table 1

因多样性指数 H_t 为 0.244 3, 居群内多样性指数 H_s 为 0.048 7, 居群间基因分化系数 G_{st} 为 0.800 5, 存在较大的遗传分化。居群每代迁移数 N_m 为 0.124 6。桃儿七有 80.05% 的遗传变异来自

居群之间, 19.95% 来自居群内, 居群间的分化极其显著。供试的桃儿七 6 个居群被聚为 2 个类群: 群 I 中, 小中甸唐木纳村居群 (tm) 和小中甸南比次居群 (zz) 先聚合, 再和其他 2 个居群聚为大类群; 群 II

由中甸丫口居群(yy)和中甸碧塔海居群(bb)组成。作为外类群的川八角莲在聚类图上明显与桃儿七分开。各居群遗传距离的UPGMA聚类见图2。

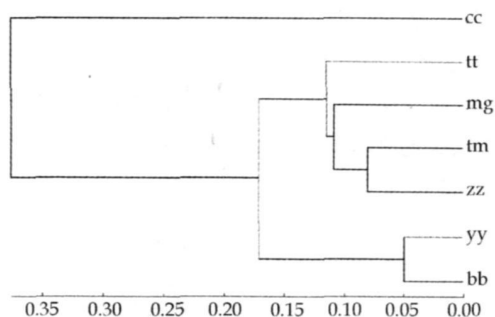


图2 桃儿七6个居群及川八角莲1居群UPGMA聚类图

Fig 2 Dendrogram of six populations of *S. hexandrum* and one population of *D. weitchii* by UPGMA

3 讨论

遗传多样性是物种避免灭绝而长期生存的前提,种内遗传多样性或变异愈丰富,物种对环境变化的适应能力就愈强,其进化的潜力就越大^[7]。

桃儿七主要以自花授粉为主,偶发生异花授粉,从花出土到开花结束只要3~4 d^[8]。本研究结果表明,这特殊的繁育体系在很大程度上影响了桃儿七居群的遗传变异式样,所检测的6个居群总的PPB值为69.33%,居群平均PPB水平为14.22%。

用分子标记检测遗传变异的方法很多,在以往的研究中发现,同一物种采用不同的方法检测其遗传多样性会得到不同的结果,这种差异是由所采用的检测方法本身的灵敏度和其他一些因素决定的^[9]。王海英^[6]在对丽江山慈菇的遗传研究中发现,DALP分子标记所检测到遗传多样性明显比RAPD分子标记检测到的要多。云南桃儿七居群的多态位点百分率和肖猛^[10]对四川的桃儿七居群检测出来的结果差不多,都呈现较低的遗传多样性;而云南桃儿七居群总的PPB大于肖猛^[10]检测得出的结果,这可能是检测方法和不同地区采样综合造成的。

居群基因流较小时($N_m < 1$),有限的基因流会加大居群之间的遗传分化。因此,往往当 N_m 减小时, G_{st} 值就会升高。在遗传分化研究中发现,桃儿七居群每代迁移数 N_m 仅为0.1246,而居群基因分化系数 G_{st} 达到了0.8005。肖猛^[10]发现四川的桃儿七居群出现了遗传分化,居群间的分化大于居群内的分化。本实验研究表明云南桃儿七居群间分化剧烈,居群之间的基因交流受到较大的阻碍($N_m < 1$),检测结果也从分子水平上进一步验证了马绍宾和胡志浩^[11]从生态学上研究得出的结论,桃

儿七是一种自花授粉植物,居群间基因流动不是很有效,一些桃儿七居群表现出多型性。

近几年,随着人们对桃儿七用途的增加,其药用需求量越来越大。特别是利用其所含的鬼臼毒素作为合成抗癌药物原料以后,人们对其大规模挖掘,对桃儿七的破坏极大。在桃儿七被大规模挖掘的地方,残存的个体避难到难以被人们挖掘的灌木丛、树根丛和石缝中生存,导致了遗传漂变等不利因素的发生。田英等^[12]在对宁夏六盘山野生桃儿七资源调查时得出:野生桃儿七在该地区已成为濒危物种。肖猛^[10]也发现四川的一些桃儿七居群受人干扰较为严重,生境受到破坏,桃儿七被大量采挖,残存的植株生长细弱,居群遗传多样性较低。虽然本次对云南桃儿七居群的调查并未发现大规模采挖,但是丫口居群和南比次居群都受到人为放牧的影响;石卡山地区由于修建风景区使该桃儿七居群受到人为干扰严重。

研究表明虽然桃儿七在物种水平上具有丰富的遗传多样性和进化潜力,但在居群水平上出现遗传多样性较低的情况,也许因其是自花授粉植物,也可能由于在局部地区过度采集或者不合理的开发,使其遗传结构和遗传多样性的丰富度遭到严重的威胁,如果不尽快实施保护策略,可能会直接造成资源的枯竭,以及在局部区域的濒危。因此对桃儿七野生居群的保护迫在眉睫,对桃儿七生长的地方,可以通过制定法规条例来增进和提高民众保护环境意识,禁止人为破坏等措施进行保护。而对一些破坏地残留的居群,要恢复和加强居群的生活力。根据群落学调查研究结合桃儿七的分子变异式样,桃儿七居群间分化强烈,所以在对桃儿七种质资源进行迁地保护时,要尽可能多地采集不同生境的居群,每个居群要采集一定的个体,一些小居群也要有一定的采样策略,才能最大限度地维持种内遗传多样性水平,这也是持续利用遗传资源的前提和基础。

参考文献:

- [1] 应俊生. 八角莲属和桃儿七属(新属)研究[J]. 植物分类学报, 1979, 17(1): 17-23.
- [2] 虞泓. 珍稀植物桃儿七[J]. 植物杂志, 1999, 3: 6-7.
- [3] 应俊生. 中国植物志[M]. 第29卷. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [5] Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(6): 1458-1465.
- [6] 王海英, 虞泓, 李南高, 等. 云南丽江山慈菇遗传多样性的DALP分析[J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 156-162.
- [7] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 马绍宾, 徐正尧, 胡志浩. 桃儿七繁殖生物学研究[J]. 西北

- 植物学报, 1997, 17(1): 49-55
- [9] 李 昂, 葛 颂. 植物保护遗传学研究进展 [J]. 生物多样性, 2002, 10(1): 61-71.
- [10] 肖 猛. 濒危植物桃儿七的遗传多样性研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006
- [11] 马绍宾, 胡志浩. 桃儿七分布格局与生态适应的初步研究 [J]. 武汉植物学研究, 1996, 14(1): 47-54
- [12] 田 英, 郭 帅, 彭 励, 等. 宁夏六盘山濒危植物桃儿七的生存现状及保护对策研究 [J]. 农业科学研究, 2006, 27(2): 82-85

见血封喉内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究

戴文君¹, 张秀环¹, 黄贵修², 戴好富¹, 梅文莉^{*}

(1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 2 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:目的 分离和鉴定见血封喉 *Antiaris toxicaria* 根韧皮部中的内生真菌, 并检测其抑菌活性。方法 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 和白色念珠菌 *Candida albicans* 作为指示菌, 采用杯碟法对内生真菌发酵上清液进行抑菌试验。结果从见血封喉根的韧皮部中分离出 6 株内生真菌, 经形态鉴定分属于聚端孢霉属 (*Trichothecium* LK. ex Fr.)、枝顶孢霉属 (*Acremonium* LK. ex Fr.) 和丝核菌属 (*Rhizoctonia* DC. ex Fr.)。其中内生真菌 J6 的发酵上清液对 MRSA 有抑菌活性, 抑菌圈直径为 18 mm。结论 首次对见血封喉内生真菌进行了研究, 内生真菌 J6 对 MRSA 有明显的抑菌活性, 其抑菌活性成分值得进一步研究。

关键词: 见血封喉; 内生真菌; 抑菌活性

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0955-03

Isolation, identification, and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Antiaris toxicaria*

DAI Wen-jun¹, ZHANG Xiu-huan¹, HUANG Gui-xiu², DAI Hao-fu¹, MEI Wen-li¹

(1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2 Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: Objective To isolate and identify endophytic fungi from the phloem in the root of *Antiaris toxicaria* and detect the antimicrobial activity of these strains. **Methods** *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and *Candida albicans* were selected as indicators. The antimicrobial activities of the fermentation filtrate of endophytic fungi were tested by cylinder plate method. **Results** Six endophytic fungi were isolated from the phloem in the root of *A. toxicaria*. These strains were morphologically identified to genus of *Trichothecium* LK. ex Fr., *Acremonium* LK. ex Fr. and *Rhizoctonia* DC. ex Fr. The fermentation filtrate of endophytic fungus J6 showed the antimicrobial activity against MRSA. The diameter of inhibition zone was 18 mm. **Conclusion** It's the first report about the endophytic fungi from *A. toxicaria*. Endophytic fungus J6 exhibits strong antimicrobial activity against MRSA, its active components are of worth to further study.

Key words: *Antiaris toxicaria* (Pers.) Lesch.; endophytic fungi; antimicrobial activity

植物内生真菌是指生长于植物的根、茎、叶等组织和器官内的一类真菌, 是植物微生态系统中的重

要组成成分, 在进化过程中与植物宿主建立了和谐的共生关系, 其次生代谢产物十分丰富, 是新化合

* 收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 973 计划前期研究专项(2007CB116306); 海南省自然科学基金资助项目(30608); 海南省自然科学基金指导性项目(80671)

作者简介: 戴文君(1984—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 现主要从事微生物学研究。

Tel: (0898) 66968572 E-mail: daishu19842003@yahoo.com.cn

* 通讯作者 梅文莉 Tel: (0898) 66988061 E-mail: meiwenli@yahoo.com.cn