

珠子草遗传多样性的 ISSR 分析

张忠廉, 唐德英, 张丽霞, 宋美芳, 李学兰*

中国医学科学院 药用植物研究所云南分所, 云南 景洪 666100

摘要: **目的** 对分布于我国及缅甸、老挝 30 个居群的珠子草进行遗传多样性分析, 为珠子草遗传连锁图谱构建、种质资源保存及遗传育种等研究提供一定的理论依据。**方法** 采用 ISSR 分子标记技术, 对采自我国云南、广西、广东、福建、海南及缅甸、老挝共 30 个珠子草居群进行多态性和聚类分析。**结果** 从 60 个 ISSR 引物中筛选出 23 条进行扩增, 共扩增得到条带 158 条, 其中共有条带 43 条, 多样性条带 115 条, 多态位点百分率 (PPB) 为 72.78%, Nei's 基因多样性 (H) 为 0.483 2, Shannon's 多态性信息指数 (I) 为 0.676 0, 多态性较高。**结论** 我国珠子草居群大致分为沿海及内陆两大类, 个别居群呈现明显的居群特异性, 种质资源遗传多样性较高。

关键词: 珠子草; 遗传多样性; ISSR; 居群; 聚类分析

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2125-05

ISSR analysis on genetic diversity in *Phyllanthus nriuri*

ZHANG Zhong-lian, TANG De-ying, ZHANG Li-xia, SONG Mei-fang, LI Xue-lan

Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China

Key words: *Phyllanthus nriuri* Linn.; genetic diversity; ISSR; population; cluster analysis

珠子草 *Phyllanthus nriuri* Linn. 为大戟科叶下珠属植物, 又名苦味叶下珠、月下珠、小返魂、霸贝菜, 滇南傣族民间称“水米草”, 为我国与印度民间传统草药, 药用全草, 具有平肝清热、利水解毒之功效, 用于治疗肠炎、肝炎、痢疾、尿路感染、无名肿痛等症状, 还可用于治疗小儿疳积、黄疸肝炎等病症^[1-3], 一年生草本, 在我国主要分布于云南、广东、广西、海南等热带、亚热带地区。1988 年, 诺贝尔奖获得者 Blumberg 博士与印度学者协作报道珠子草对治疗慢性乙型肝炎病毒携带者有显著疗效^[4], 自此以后, 国内外关于珠子草的研究报道日益增多, 使人们对珠子草有更深入的了解^[5-6]。但随之而来的是人们对珠子草野生资源的肆意采收, 使其野生资源日益匮乏。本实验采用 ISSR 分子标记技术对来自我国云南、广东、广西、海南、福建 5 个省份及缅甸、老挝不同居群的珠子草进行遗传多样性分析, 为珠子草遗传图谱的构建、种质资源的保存及遗传育种等研究提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

所用样品共 30 份, 经中国医学科学院药用植物研究所云南分所唐德英研究员鉴定为珠子草 *Phyllanthus nriuri* Linn., 具体样品来源见表 1。收集当年生新鲜嫩叶, 经硅胶快速干燥后带回实验室, -20 °C 低温保存。

1.2 试剂与仪器

DNA 提取试剂盒: TIANGEN (DP305); ISSR 引物, 上海生工生物技术有限公司合成; rTaq DNA 聚合酶 (大连宝生物工程有限公司, DR001B) 包括: TaKaRa Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL), 10×缓冲液 (Mg^{2+}), dNTP (各 2.5 mmol/L), $MgCl_2$ (25 mmol/L); Marker, 北京鼎国生物技术有限公司 (B031); 其他试剂均为分析纯。

离心机 (Eppendorf, Centrifuge 5424), 振荡器 (Qilinbeier, QL-861), 扩增仪 (Biometra Professional Standard), 电泳仪 (Biometra 公司), 凝胶成像系统 (Uvtec 公司, Uvixs-D55-20M)。

收稿日期: 2011-04-13

作者简介: 张忠廉 (1982—), 男, 山西省阳泉市人, 助理研究员, 硕士研究生, 从事药用植物种质资源方面的研究, 主要研究方向为药用植物分子生物学。Tel: 15924692393 E-mail: zzl0605@163.com

***通讯作者** 李学兰 Tel: 13988183210 E-mail: xlli_212@163.com

表 1 珠子草种质资源来源
Table 1 Germplasm resources of *P. nriuri*

编 号	采集地	经 度	纬 度	海拔/m
1	云南省勐海县打洛镇	100°08'07.2"	21°43'06.7"	702
2	广西崇左市宁明县寨安乡	107°03.675'	22°05.320'	150
3	云南省景洪市勐养镇	100°53'28.3"	22°06'27.0"	748
4	云南省景洪市勐龙镇	100°40'57.2"	21°35'05.9"	624
5	云南省景洪市勐海县勐往乡	100°28'13.9"	22°23'12.4"	808
6	云南省玉溪市新平县漠沙镇	101°45'21.8"	23°50'09.3"	508
7	云南省玉溪市新平县嘎洒镇	101°35'18.5"	24°00'38.5"	521
8	缅甸南板县	100°39'60.5"	21°23'32.8"	487
9	广西省南宁市南药园	108°22'254"	22°51'600"	136
10	云南省玉溪市元江县李江镇	102°00'21.5"	23°35'44.4"	384
11	云南省景洪市橄榄坝	101°58'56.05"	21°51'40.03"	534
12	云南省玉溪市元江县东峨镇	101°51'09.9"	23°41'03.7"	770
13	云南德宏州瑞丽市	98°02'57.2"	24°04'49.9"	844
14	海南省昌江县霸王岭	109°07.674'	19°05.969'	378
15	云南省红河州元阳县	102°56'07"	23°11'41.7"	290
16	海南省万宁县兴隆镇	109°29'999"	19°30'887"	57
17	海南省儋州市	109°30.048'	19°30.855'	100
18	广东省茂名市电白县	111°00.033'	21°30.627'	30
19	福建省厦门鼓浪屿	118°03.463'	24°26.703'	10
20	云南省红河州河口县	103°55'53.5"	22°31'59.9"	92
21	福建省漳州市	117°41.770'	24°33.033'	20
22	云南省景洪市勐仑镇	101°14'24"	21°56'08.6"	619
23	云南省景洪市勐腊镇	101°33'47.3"	21°28'43.2"	641
24	云南省景洪市勐腊县关累镇	101°15'32.8"	21°42'39.2"	583
25	云南省景洪市勐腊县勐满镇	101°18'13.9"	21°16'53.7"	616
26	云南省普洱市江城	101°44.161'	22°31.496'	928
27	老挝琅勃拉邦省南坎县	102°23'59.0"	20°34'33.9"	385
28	老挝琅勃拉邦	102°08'12.1"	19°53'08.00"	277
29	云南省临沧市永德县永康镇	99°27'47.2"	24°11'46.9"	894
30	云南省临沧市耿马县孟定镇	99°09'43.8"	23°36'44.5"	541

1.3 ISSR-PCR 反应

1.3.1 基因组 DNA 的提取 药材经灭菌水清洗晒干后，液氮充分研磨，按照天根生物技术有限公司生产的 DP305 型植物 DNA 快速提取试剂盒的方法提取基因组 DNA。所提 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测，核酸蛋白分析仪测其原始质量浓度，适当稀释后，-20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 反应 ISSR 反应体系为 20 μL: Mg²⁺ 1.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.5 μmol/L、TaqDNA 聚合酶 1.25 U、缓冲液 2 μL 和模板 DNA 20~50 ng，加 dd H₂O 至 20 μL。

PCR 扩增程序：94℃ 预变性 4 min；接着进行 30 个循环：94℃ 变性 45 s，50~55℃（因引物序

列不同退火温度不同）退火 45 s，72℃ 延伸 2 min；循环结束后 72℃ 延伸 10 min。各取 PCR 反应液 5 μL，加 1 μL 缓冲液，在 2% 琼脂糖凝胶上电泳，电压 100 V，电泳 90 min，经溴化乙锭（EB）染色后在凝胶成像仪上观察并照相记录。

1.3.3 引物筛选 ISSR 引物序列按照加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室的 ISSR 引物序列设计，由上海生工生物技术有限公司合成，共 60 个引物。从 60 个 ISSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多样性好、重复性高的 ISSR 引物用于样品的遗传多样性分析，每个选定的引物重复扩增 2 次。每条引物退火温度进行摸索，使之达到最好扩增效果。

1.3.4 数据统计 利用所筛选出的引物扩增所有

珠子草样品, 扩增电泳 2 次。针对某一同源带(同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带)有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 生成 0、1 二态性数据矩阵; 对于较弱条带, 如在重复性试验中反复出现, 赋值 1。利用 PopGene32 对其进行分析, 统计多态性位点百分率(*PPB*)、*Nei's* 基因多样性(*H*)、*Shannon's* 信息指数(*I*); 根据 *Nei's* 遗传距离, 采用 NTSYS-pc2.1 分析软件的 UPGMA 法进行系统聚类分析, 构建系统聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及遗传多样性分析

对于显性标记的 ISSR, 每一条扩增条带都对应着一个 DNA 分子位点, 出现多态性扩增带, 说明样品在该位点存在差异。对 60 个 ISSR 引物进行筛选, 共筛选出 23 个扩增条带较多、谱带清晰、多态性较

好的引物用于 ISSR-PCR 分析, 具体引物序列、退火温度及条带扩增数见表 2。用筛选出的引物对 30 份材料进行 PCR 扩增, 并对扩增片段进行统计分析。大部分条带长度在 200~2 000 bp, 不同引物扩增的位点数在 3~11, 平均每个引物检测到 7 个位点, 形成了带型丰富、片段大小及其组合不同的电泳图谱。图 1、2 为引物 UBC855 对 30 个样品的扩增结果。

共扩增得到 158 条条带, 其中共有条带数 43, 多样性条带数 115, *PPB* 值为 72.78%, *H* 值为 0.483 2, *I* 值为 0.676 0, 多态性较高。遗传相似系数(*GS*)指标可以说明各居群间彼此遗传关系的远近, 30 个居群间的 *GS* 系数在 0.626 6~0.968 4, 其中样品 2 与 9、10 与 12 间的 *GS* 值最高, 达到 0.968 4, 样品 8 与 28 间的遗传关系最远, *GS* 仅为 0.626 6。总体上, 各居群间的遗传多样性相当丰富。

表 2 所筛选出的引物及引物扩增条带数
Table 2 Screened primers and their amplification bands

编 号	引物序列	退火温度/℃	总扩增条带数	共有条带数	编 号	引物序列	退火温度/℃	总扩增条带数	共有条带数
UBC 807	(AG) ₈ T	52	5	3	UBC 844	(CT) ₈ RC	55	6	1
UBC 809	(AG) ₈ G	54	6	3	UBC 845	(CT) ₈ RG	55	5	1
UBC 810	(GA) ₈ T	52	4	3	UBC 846	(CA) ₈ RT	53	6	2
UBC 818	(CA) ₈ G	54	8	1	UBC 847	(CA) ₈ RC	55	7	3
UBC 821	(CA) ₈ T	52	7	1	UBC 848	(CA) ₈ RG	55	11	2
UBC 825	(AC) ₈ T	52	10	4	UBC 850	(GT) ₈ YC	55	6	1
UBC 827	(AC) ₈ G	54	10	2	UBC 851	(GT) ₈ YG	55	7	0
UBC 828	(TG) ₈ A	52	7	0	UBC 853	(TC) ₈ RT	53	3	1
UBC 831	(AC) ₈ YA	53	6	4	UBC 855	(AC) ₈ YT	53	8	2
UBC 834	(AG) ₈ YT	53	4	2	UBC 856	(AC) ₈ YA	53	7	3
UBC 840	(GA) ₈ YT	53	5	0	UBC 857	(AC) ₈ YG	55	11	3
UBC 841	(AG) ₈ YC	55	8	1					

2.2 聚类分析

根据样品居群间 *GS* 值, 运用 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic-means) 方法进行聚类分析, 所得聚类结果见图 3。总体上看, 各居群亲缘关系远近与其地理分布距离及气候类型有直接关系, 样品采集地点地理位置距离越远, 样本的亲缘关系越远, 距离越近, 亲缘关系越近。首先是样品 8、28、14 各成一支, 说明此 3 份样品与其他居群均有较大的遗传距离; 在 *GS* 为 0.81 时分为两大支, 一支由云南省内部分居群组成, 包括来自景洪、临沧、德宏、玉溪、普洱地区的样品; 另一支以广西、广东、福建、海南等沿海地区样品

为主要组成部分, 其中还包括来自云南省红河州、景洪市勐腊县等地区的样品。值得注意的是, 样品 27 与 28 虽同是来自老挝的样品, 但二者遗传距离较大, *GS* 仅为 0.740 5, 样品 28 自成一支, 样品 27 却与来自广西、景洪勐腊地区的样品聚为一支; 样品 14、16、17 均为来自海南省境内的样品, 但样品 14 独立为一支, 样品 16 与 17 聚为一支, 且与样品 14 遗传距离较大, *GS* 分别为 0.702 5、0.759 4, 进一步证明珠子草在不同居群间丰富的遗传多样性。

3 讨论

珠子草, 一年生草本植物, 喜湿热, 生长温度平均 20 ℃, 相对湿度 75%以上, 多生长于路侧、

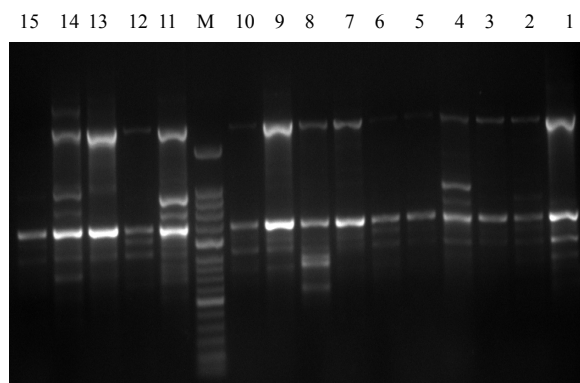


图 1 引物 UBC855 对样品 1~15 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR-PCR amplification of 1—15 samples with Primer UBC855

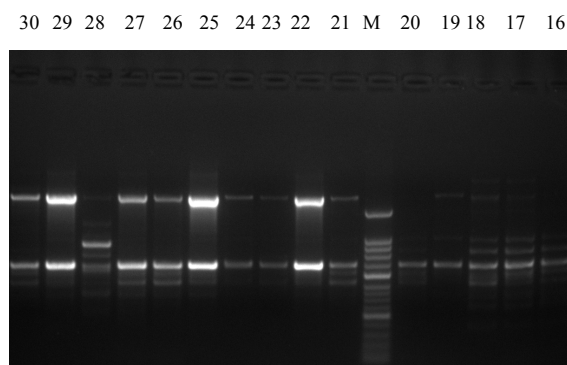


图 2 引物 UBC855 对样品 16~30 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 2 ISSR-PCR amplification of 16—30 samples with Primer UBC855

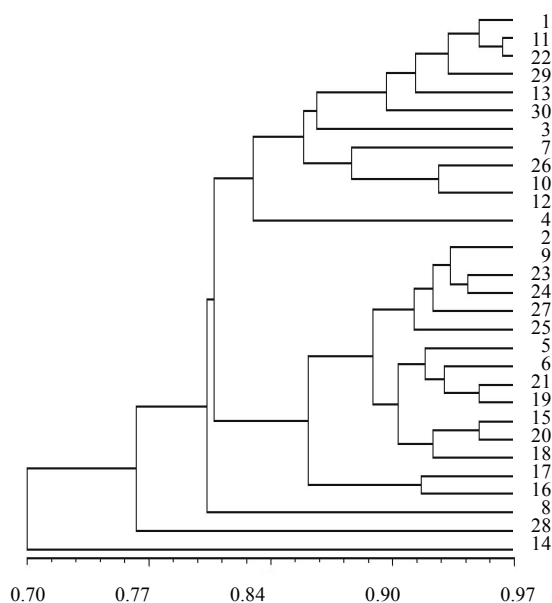


图 3 以 Nei's 遗传距离构建的珠子草 ISSR 聚类图

Fig. 3 ISSR dendrogram of *P. nriuri* based on Nei's genetic distance

沟边、渠旁、荒滩等阴湿之地，主要分布在热带、亚热带雨林地区，但近年有文献报道珠子草在我国北方地区引种栽培效果良好^[7]，充分说明其较强的环境适应能力。而一个物种对环境变化的适应能力强弱与否建立在其是否具有丰富的遗传多样性或基因遗传变异能力之上，种内遗传多样性或遗传变异越丰富，物种对环境变化的适应能力越强。近年来，ISSR分子标记技术被广泛应用于药材的遗传多样性分析中^[8-10]。本实验运用ISSR分子标记技术，对珠子草的遗传多样性进行分析，结果显示，珠子草具有丰富的遗传多样性，从DNA水平上验证了珠子草各居群间丰富的遗传变异能力，一方面充分说明珠子草具有较强的环境适应能力，另一方面对珠子草育种材料遗传背景的研究和种质利用有较好的参考价值。

从 ISSR 聚类图可以看出，广东、广西等沿海地区的珠子草居群亲缘关系较近，聚为一支；云南省内各珠子草居群聚为一支，个别居群如云南红河州及景洪市勐腊县虽地处云南省境内，遗传背景却与广东等沿海城市居群相近，这与其地理位置靠近广西等地有直接关系，可能是作为沿海居群及内陆居群的一个交集地带；个别居群与其本地居群地理位置相近但亲缘关系却较远，此种情况可能与每个居群特殊的环境因素有关，具体影响因素还需进一步探索。

珠子草是我国及印度民间具有代表性的民族药，了解其遗传多样性及各居群遗传变异的分布格局对于制定珠子草种质资源采集及保护策略具有指导性作用。通过本实验可知，珠子草遗传多样性丰富，且个别居群种质资源具有很明显的基因特异性。所以，在对珠子草进行种质资源调查及保护时应尽可能多地涉及到各个居群，尤其是那些具有基因特异性的居群，以尽可能地保持其物种水平较高的遗传多样性。作为药用植物，其发挥特殊药理活性的有效成分大多数是植物自身的次生代谢产物，而次生物质在协调植物与环境的关系上充当重要角色，即次生代谢物质是植物为适应一定的环境变化长期生存选择的结果^[11-13]，换句话说，外界生存环境条件的不同在某种程度上会导致相同品种的药用植物体内次生代谢物质产生变化，所以，从药用角度来说，也应尽量完善地保护珠子草种质资源遗传多样性、避免近交衰退的同时，加大珠子草异地栽培研究，同时对遗传特异性强的个别居群进行引种驯化。

参考文献

- [1] 广西中医药研究所. 广西药用植物名录 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1984.
- [2] Thyagarajan S P, Subramanian S, Thirunalasundari T, *et al.* Asian Pacific association for the Study of the Liver 6th Biennial Scientific Meeting Feb [C]. India: Delhi, 1988.
- [3] Venkateswaran P S, Millman T, Blumberg B S, *et al.* Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: *In vivo* and *in vitro* study [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84: 274-278.
- [4] Thyagarajan S P, Subramanian S, Blumberg B S, *et al.* Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus [J]. *Lancet*, 1988, 1: 764-766.
- [5] Calixto J B, Santos A R S, Cechinel F V, *et al.* A review of the genus *phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential [J]. *Med Res Rev*, 1998, 18: 225-258.
- [6] 黎香荣, 周 昊, 韦万兴. 珠子草化学成分和生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 890-896.
- [7] 李彩东, 梁 云, 李惠新, 等. 珠子草在北方的栽培技术研究 [J]. 中药研究与信息, 2005, 2(7): 29-30.
- [8] 许永华, 张爱华, 金 慧, 等. 人参种源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [9] 李 佳, 房敏峰, 周天华, 等. 主产区远志种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1881-1885.
- [10] 杨生超, 文国松, 刘雪玲, 等. 灯盏花种质资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1523-1527.
- [11] 黄璐琦, 陈美兰, 肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 494-496.
- [12] 阎秀峰. 植物次生代谢生态学 [J]. 植物生态学报, 2001, 25(5): 639-640.
- [13] 段传人, 王伯初, 徐世荣. 环境胁迫对植物次生代谢的影响 [J]. 重庆大学学报, 2003, 26(10): 67-71.

欢迎订阅 2012 年《药学报》

《药学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870) 是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目: 述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来, 一直报道药学领域原始性、创新性科研成果, 旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学报》为我国自然科学核心期刊, 据中国科学引文数据库的统计数据, 在中国科技核心期刊排行表中, 《药学报》名列前茅, 在药学类期刊中居首位; 本刊已被世界主要检索系统收录, 为我国药学界高水平的学术刊物, 在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”, 2001 年入选中国期刊方阵“双高”(高知名度、高学术水平) 期刊; 2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”, 并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖; 2002~2009 年连续 8 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号; 2008~2010 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助(B类); 2011 年荣获第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

本刊为 128 页, 月刊, 大 16 开本。每期定价 40 元, 全年定价 480 元。国内邮发代码: 2-233, 国外代码: M105。欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下:

- 通过当地邮局;
- 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn) 或从网上 (www.yxxb.com.cn) 下载订阅单, 填好后寄至编辑部;
- 通过本刊编辑部, 联系人: 李淑芬、张晓晔

电话: (010)63165208

传真: (010)63035012

编辑部地址: 北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部 (邮编 100050)