

叶下珠种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

张忠廉, 李学兰, 张丽霞, 宋美芳, 唐德英*

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 30 个居群的叶下珠进行遗传多样性分析。方法 采用 ISSR 分子标记技术, 研究来自我国重庆、陕西、河南、云南、广西、广东、浙江、贵州、福建、海南省区共 30 个叶下珠居群的遗传多样性。结果 从 60 个 ISSR 引物中筛选出 24 个用于扩增, 共扩增得到 264 条条带, 其中共有条带 19 条, 多样性条带 245 条, 多态位点百分率 (PPB) 为 92.80%, 遗传相似性系数 (GS) 值在 0.579 5~0.916 7, 多态性较高。UPGMA 聚类结果显示我国叶下珠居群大致可以分为 3 支, 即内陆分支、沿海分支及位于云南省区的过渡分支; 个别居群呈现明显的居群特异性。结论 叶下珠种质资源遗传多样性较高。

关键词: 叶下珠; 遗传多样性; ISSR; 聚类分析; 遗传相似性系数

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0159-05

ISSR analysis on genetic diversity in *Phyllanthus urinaria*

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

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

Abstract: **Objective** To detect the genetic diversity of 30 populations of *Phyllanthus urinaria* from some provinces of China. **Methods** ISSR was used to analyze the genetic diversity of 30 populations of *P. urinaria* from Chongqing, Shaanxi, Henan, Yunnan, Guangxi, Guangdong, Zhejiang, Guizhou, Fujian, and Hainan Provinces of China. **Results** Twenty four primers selected from 60 ISSR primers were used for amplification and a total of 264 DNA bands were obtained, including 245 polymorphic bands and 19 common bands. At species level, the average percentage of polymorphic bands (PPB) was 92.80%. The range of the genetic similarity (GS) value was 0.579 5—0.916 7, with a higher genetic diversity. Cluster analysis showed that the *P. urinaria* population was roughly divided into three branches: inland branch, coastal branch, and transition branch which located in Yunnan Province; Individual populations presented obvious specificity. **Conclusion** The genetic diversity of germplasm resources in *P. urinaria* is higher.

Key words: *Phyllanthus urinaria* Linn.; genetic diversity; ISSR; cluster analysis; genetic similarity (GS)

叶下珠 *Phyllanthus urinaria* Linn. 为大戟科叶下珠属植物, 别名珍珠草、阴阳草、夜合草, 一年生草本, 全草入药, 是传统的中药材, 具有清肝明目、渗湿利尿、解毒的功效, 用于黄疸、肝炎等治疗^[1]; 现代药理研究表明叶下珠具有抗炎、抗过敏、抗肿瘤、抗病毒、利胆、利尿、改善肾功能等功效, 具有明显抗乙型肝炎病毒的作用及对肝损伤的保护作用^[2]。叶下珠主产于我国河北、山西、陕西、华东、华中、华南、西南等省区, 通常生于海拔 500 m 以下的旷野平地、旱田、山地路旁或林缘, 在云南海拔 1 100 m 的湿润山坡草地亦见有生长^[3]。近年来, 国内外对叶下珠的研究日益增多, 尤其在对其治疗病毒性乙型肝炎机制方面的研究日益完善^[4]。与此同时, 国内外对不同产

地叶下珠的化学成分及药理作用方面研究有诸多报道, 叶下珠不同产地间的化学成分有很大差异, 且所表现的药理作用也有明显差异^[5-8]。本实验运用 ISSR 分子标记技术对来自我国 10 个省市的不同叶下珠居群 (共计 30 份样品) 进行遗传多样性分析, 旨在为叶下珠种质资源评价奠定基础, 同时为叶下珠遗传连锁图谱构建、种质资源保存及遗传育种等研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

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副研究员鉴定为叶下珠 *Phyllanthus urinaria* Linn., 具体样品来源见表 1。

收稿日期: 2011-05-19

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 唐德英 Tel: 15969192309 E-mail: tdy629@126.com

收集当年生新鲜嫩叶,经硅胶快速干燥后带回实验室内-20℃低温保存。

1.2 仪器与试剂

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 TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 10 $\times$ Buffer (Mg^{2+} free), dNTP mixture (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。

扩增仪 (biometra professional standard), 电泳仪 (Biometra 公司), 凝胶成像系统 (Uvitec 公司)。

1.3 ISSR-PCR 反应

1.3.1 基因组 DNA 的提取 材料经灭菌水清洗晒干后, 液氮充分研磨, 按照 DNA 快速提取试剂盒所提

供方法提取基因组 DNA。所提 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经适当稀释后-20℃保存备用。

1.3.2 PCR 反应 ISSR 反应体系 (20 μ L): Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、TaqDNA 聚合酶 1.25 U、缓冲液 2 μ L 和模板 DNA 20~50 ng, 加 dd H₂O 至 20 μ L。

PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 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 μ L, 加 1.0 μ L 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

表 1 叶下珠种质来源

Table 1 Germplasm resources of *P. urinaria*

编 号	采集地点	经 度	纬 度	海拔 / m
1	云南省玉溪市新平县	101°43'20.0"	23°50'46.8"	586
2	重庆市北碚区歇马镇	106°22'36.3"	29°45'31.8"	246
3	广东省广州市华南植物园	113°21.475'	23°11.376'	80
4	广西崇左市宁明县	107°2.895'	21°50.913'	230
5	云南省景洪市勐养镇	100°53'28.3"	22°06'27.0"	748
6	福建省漳州市农科所苗圃	117°41.770'	24°33.033'	20
7	云南文山州富宁县	105°56'37.2"	23°37'33.8"	765
8	云南省景洪市勐腊县	101°14'25"	21°56'8.7"	620
9	广东省阳春市	111°54.359'	22°10.719'	110
10	广西省南宁市南药园	108°22'254"	22°51'600"	136
11	云南玉溪市元江县	101°51'09.9"	23°41'3.7"	770
12	云南省景洪市勐海县	100°28'13.9"	22°23'12.4"	808
13	贵州省赤水市旺隆镇	105°51'14.7"	28°32'11.3"	372
14	云南文山州麻栗坡县	104°42'49.4"	23°8'56.8"	1 258
15	云南省临沧地区沧源县	99°11'22.8"	23°16'10.6"	1 782
16	云南德宏州瑞丽市勐秀乡	97°51'42.5"	24°5'55.4"	1 318
17	河南省信阳市新县	114°50'39.7"	31°35'23.0"	259
18	福建省漳州市长泰县	117°51.151'	24°42.239'	370
19	海南省万宁市万宁县	109°29'999"	19°30'887"	57
20	陕西省安康市	109°1'59.2"	32°38'23.6"	914
21	云南德宏州瑞丽市热作所	97°51'45.3"	24°1'18.8"	780
22	福建省厦门鼓浪屿	118°3.463'	24°26.703'	10
23	浙江省杭州植物园	120°7'48.08"	30°15' 25.85"	47
24	云南省普洱地区江城县	101°27.299'	22°36.237'	1 255
25	云南德宏州梁河县	98°20'19"	24°50'51.3"	1 050
26	云南省临沧地区双江县	99°26'17.2"	23°20'26.1"	951
27	云南省临沧地区镇康县凤尾镇	99°00'21.9"	23°54'13.8"	855
28	云南省临沧地区耿马县	98°54'52.6"	23°29'51.7"	652
29	云南省临沧地区镇康县南伞城	98°49'16.1"	23°46'21.5"	941
30	云南省临沧地区沧源县城	99°14'58"	23°8'52"	1 221

比亚大学生物技术实验室的引物序列设计,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单独摸索,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叶下珠样品,实验结果均需重复扩增和电泳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,如在重复性实验中反复出现,赋值“1”。统计多态性位点百分率(PPB)、Nei's 基因多样性(H);根据Nei's 遗传距离(genetic distance, GD)及遗传相似系数(genetic similarity, GS),采用NTSYS-pc 2.1分析软件的UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)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24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。绝大部分条带长度在200~2 000 bp,不同引物扩增的位点数在5~17,平均每个引物检测到11个位点,形成了带型丰富、片段大小及组合不同的电泳图谱。图

1为引物UBC846对30个样品的扩增结果。

共扩增得到264条条带,其中共有条带19条,多态性条带245条,PPB高达92.80%,说明叶下珠各居群有很好的遗传多样性。GS和GD指标可以很好地说明各居群间彼此遗传关系的远近,30个居群间的GS值在0.579 5~0.916 7,其中,GS值最大的为9号与10号样品,GS值最小的为8号与13号、8号与20号样品。

2.2 聚类分析

运用UPGMA方法进行聚类分析,所得聚类结果如图2所示。

从UPGMA聚类图可知,GS为0.70处,样品分为2支,第一支由位于重庆市、贵州、河南、陕西省份的居群及位于云南省文山州的一个居群组成,说明他们之间有较近的亲缘关系,而另一分支由收集的其他样品组成;后者先以云南省内个别居群及一个来自于浙江省杭州植物园样品为过渡居群,在GS 0.80处又分为2支:一支以广东、海南、广西、福建4个沿海省份的居群组成,另外还包括来自云南省德宏州的2个居群;另一分支的所有聚类居群均是来自于云南省内的样品,包括临沧、玉溪、文山、德宏等地的个别居群。总体上,地理分布相近的居群聚在一起,聚类结果显示与地理分布较明显的一致性。如来自云南临沧的6个居群(15、26、27、28、29、30号样品)聚为一支。其中有个别居群并未按照这一规律进行聚类,这可能与特殊的环境有关,具体影响因素还需进一步验证。

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 / °C	总扩增条带数	共有条带数	编号	引物序列	退火温度 / °C	总扩增条带数	共有条带数
UBC807	(AG) ₈ T	52	12	0	UBC844	(CT) ₈ RC	55	16	1
UBC810	(GA) ₈ T	52	11	1	UBC846	(CA) ₈ RT	53	13	1
UBC817	(CA) ₈ A	52	12	0	UBC847	(CA) ₈ RC	55	8	2
UBC819	(GT) ₈ A	52	10	2	UBC848	(CA) ₈ RG	55	17	0
UBC820	(GT) ₈ C	54	11	0	UBC849	(GT) ₈ YA	53	8	0
UBC821	(CA) ₈ T	52	8	0	UBC850	(GT) ₈ YC	55	12	1
UBC825	(AC) ₈ T	52	11	1	UBC851	(GT) ₈ YG	55	12	0
UBC830	(TG) ₈ G	54	6	0	UBC855	(AC) ₈ YT	53	9	1
UBC831	(AC) ₈ YA	53	12	0	UBC856	(AC) ₈ YA	53	10	0
UBC834	(AG) ₈ YT	55	16	3	UBC857	(AC) ₈ YG	55	14	4
UBC835	(AG) ₈ YC	55	12	0	UBC858	(TG) ₈ RG	55	6	0
UBC842	(GA) ₈ YG	55	13	1	UBC859	(TG) ₈ RC	55	5	1

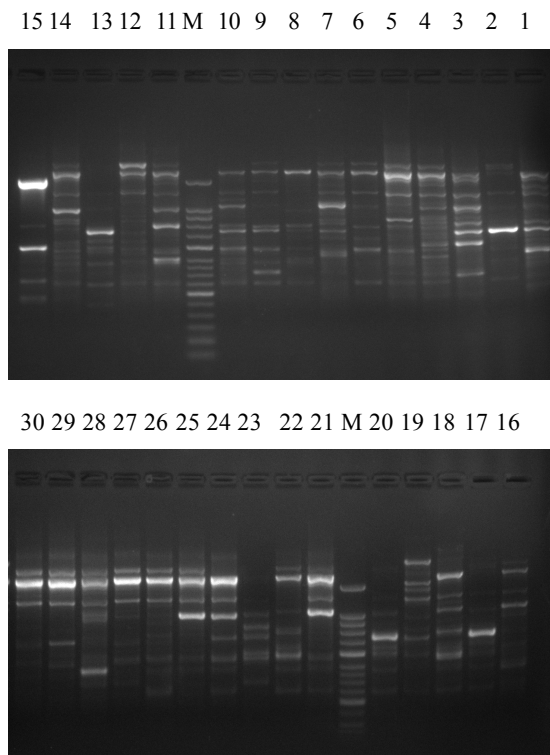


图1 引物 UBC846 对 1~30 样品的 ISSR-PCR 扩增结果
Fig. 1 ISSR-PCR amplification of 1—30 samples with Primer UBC846

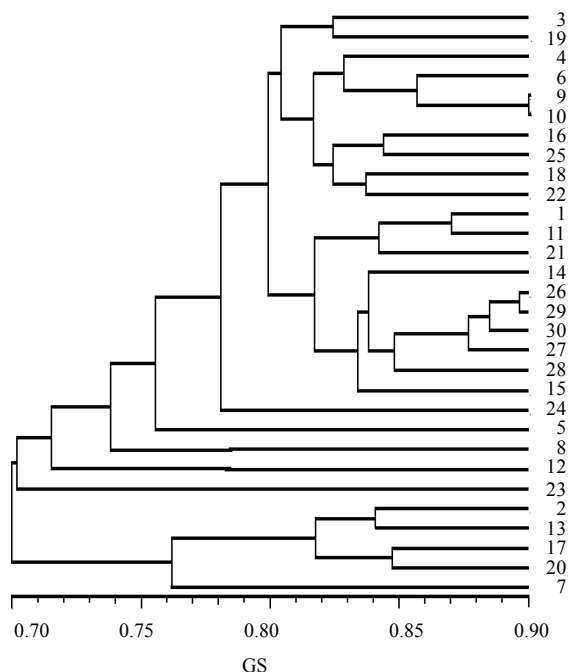


图2 以 Nei's 遗传距离构建的叶下珠 ISSR 聚类图
Fig. 2 ISSR dendrogram of *P. urinaria* based on Nei's genetic distance

3 讨论

叶下珠在我国分布广泛且主要以野生状态存

在^[9],随着研究的不断深入,需求量不断增加,使得野生资源日益减少^[10],尽管有报道叶下珠在我国引种成功栽培^[11-12],但究其质量却未见报道。因此,为了建立更加合理的叶下珠种质资源保护策略,以更好的发挥其利用价值,对其进行种质资源评估研究已刻不容缓。本实验通过 ISSR 分子标记技术对来自我国各地的不同叶下珠种质资源进行遗传多样性分析,为其以后的种质资源评价、保存及遗传育种等工作奠定基础。结果显示,叶下珠具有很好的遗传多样性,PPB 高达 92.80%,GS 值在 0.579 5~0.916 7。Hamrick^[13]认为,物种的分布范围影响其遗传变异,遗传多样性水平与该物种分布区大小成正比,广布种的遗传多样性要高于狭域种,而本实验的结果很好验证了此规律。另一方面,遗传多样性体现着物种对环境的适应能力,物种遗传多样性越丰富,适应环境的能力越强,在环境发生变化时该物种生存下来的可能性越大。叶下珠丰富的遗传多样性证明其具有很好的环境适应能力,此结果为叶下珠在各地引种栽培技术研究的可行性方面奠定了一定的理论基础。

依据 ISSR 聚类图,大致可以将叶下珠分为 3 类:第 1 类以陕西、重庆等地的内陆居群为组成部分;第 2 类以广东、海南等沿海城市的叶下珠居群为组成部分;第 3 类介于二者之间,是以云南省内的大多数居群为组成部分,可以认为是两大类群的交集地带。其中,有个别居群并不符合以上描述,如 16 号样品及 25 号样品,二者均来自内陆地区的云南省德宏州,亲缘关系却与沿海城市的叶下珠居群相近;还有来自浙江杭州的 23 号样品,按照地理位置远近,该样品本应与沿海居群聚为一类,但 ISSR 聚类图上却显示其与云南省内多数居群有较近的亲缘关系。此状况应与其个别居群所处的独特环境相关。此外,云南省作为内陆与沿海居群的过渡地带,其所包含居群自然拥有两大类群的遗传特性,外加其自然环境的多样性,使其所含居群具有相当丰富的遗传多样性,此推论在聚类图上得以很好的展现。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [2] Pettit G R, Schaufelberger D E, Nieman R A, et al. Isolation and structure of phyllanthostatin [J]. *J Nat*

- Prod*, 1990, 53(6): 1406-1413.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 15 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 袁宇熹, 林 毅, 明艳林, 等. 叶下珠抗肿瘤抗病毒研究进展 [J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(2): 77-80.
- [5] 张 岚, 任丽娟, 李克明. 不同产地和采集季节叶下珠中鞣料云实精含量的比较 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 157-159.
- [6] HPLC 法测定不同产地叶下珠中槲皮素的含量 [J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3717-3718.
- [7] 陈压西, 郭树华, 张定凤, 等. 不同产地叶下珠及叶下珠联合用药抗鸭乙型肝炎病毒疗效初探 [J]. 中华肝病学会肝脏病杂志, 1994, 2(1): 23-25.
- [8] 陈征途, 李凤仙, 邓文娣, 等. 不同品种、不同产地叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究 [J]. 中草药, 1997, 28(10): 616-617.
- [9] 赵永华, 丁 赢, 杨春清. 我国叶下珠属药用植物资源的开发利用 [J]. 生物学通报, 2000, 35(12): 39-40.
- [10] 彭建明, 管志斌, 张丽霞, 等. 苦味叶下珠家化种植技术 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(4): 18-19.
- [11] 范俊安, 张 艳, 夏勇鹏, 等. 叶下珠人工种植正交试验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 969-972.
- [12] 常 莉, 薛建平. 叶下珠愈伤组织的诱导与培养 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1723-1726.
- [13] Hamrick J L. *Gene Flow and Distribution of Genetic Variation in Plant Populations* [M]. New York: Academic Press, 1987.

天津中草药杂志社售过刊信息

天津中草药杂志社是经国家新闻出版总署批准于2009年8月在天津滨海新区注册成立。编辑出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines*、《现代药物与临床》(2009年由《国外医药·植物药分册》改刊)、《药物评价研究》(2009年由《中文科技资料目录·中草药》改刊)。欢迎投稿, 欢迎订阅。

《中草药》杂志合订本: 1974—1975年、1976年、1979年、1988—1993年(80元/年), 1996、1997年(110元/年), 1998年(120元/年), 1999年(135元/年), 2000年(180元/年), 2001—2003年(200元/年), 2004年(220元/年), 2005年(260元/年), 2006—2008年(280元/年), 2009年(400元/年), 2010年(400元/年), 2011年(550元/年)。

《中草药》增刊: 1996年(50元), 1997年(45元), 1998年(55元), 1999年(70元), 2000、2001年(70元), 2002—2007年(65元/年), 2008、2009年(55元/年)。凡订阅《中草药》杂志且提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

Chinese Herbal Medicines 合订本: 2010年(150元/年), 2011年(150元/年)。

《现代药物与临床》合订本: 2009年(120元/年), 2010年(120元/年), 2011年(120元/年)。

《国外医药·植物药分册》合订本: 1996—2008年(80元/年), 2006—2008年(90元/年)。

《药物评价研究》2009年单行本每册15元, 2010年合订本(120元/年), 2011年(120元/年)。

《中文科技资料目录·中草药》: 1993—2006年合订本(全套2040元), 2007—2008年单行本, 每册定价30元, 全年订价210元(6期十年索引)。

天津中草药杂志社

地 址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮 编: 300193

电 话: (022) 27474913 23006821

传 真: (022) 23006821

电子邮箱: zcy@tiprpress.com

网 址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com (在线投稿)

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账 号: 44114010010081504

户 名: 天津中草药杂志社