

壮药战骨种质资源遗传多样性 ISSR 分析

熊忠臣, 史艳财, 漆小雪, 邹 蓉, 蒋运生, 韦记青*

广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006

摘要: 目的 对壮药战骨种质资源的遗传多样性进行研究。方法 采用 ISSR 分子标记技术分析 9 个战骨种群的遗传多样性。结果 13 条引物共检测到 73 个位点, 其中 65 个位点具有多态性, 多态位点百分率 (PPL) 为 89.04%。战骨总的 Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.226 5, Shannon's 多样性信息指数 (I) 为 0.357 2, 各种群的平均 H 、 I 为 0.147 6、0.221 9。种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.348 4, 基因流 (N_m) 为 0.935 1。9 个种群可聚类划分为 2 个大种群组。结论 战骨种群遗传多样性为中等偏低水平; 战骨种群的遗传变异主要存在于种群内; 战骨的生物学特性和分布区域的片段化是导致种群间出现一定的遗传分化和种群遗传多样性较低的主要原因。

关键词: 战骨; 种质资源; 遗传多样性; Nei's 基因多样性指数; Shannon's 多样性信息指数; ISSR

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2040-05

ISSR analysis on genetic diversity for germplasm resources of *Premna fulva* in Zhuang medicine

XIONG Zhong-chen, SHI Yan-cai, QI Xiao-xue, ZOU Rong, JIANG Yun-sheng, WEI Ji-qing

Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Abstract: **Objective** To investigate the genetic diversity for germplasm resources of *Premna fulva* in Zhuang medicine. **Methods** The genetic diversity of the nine populations of *P. fulva* was analyzed by ISSR molecular markers. **Results** Thirteen primers produced 73 sites, among which 65 were polymorphic sites and Nei's genetic diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 0.226 5 and 0.357 2, respectively, while average H and I at population level were 0.147 6 and 0.221 9. Genetic differentiation coefficient (G_{st}) and gene flow (N_m) were 0.348 4 and 0.935 1 within the population levels. Cluster analysis indicated that the nine populations could be divided into two groups. **Conclusion** The genetic diversity among the populations of *P. fulva* is at lower-middle level. The genetic variance of *P. fulva* mainly exists among the populations. The high genetic variance among the populations and the low genetic diversity within populations could be attributed to the biological characteristics of *P. fulva* and its region segment.

Key words: *Premna fulva* Craib.; germplasm resources; genetic diversity; Nei's genetic diversity index (H); Shannon's information index (I); ISSR

“战骨”为广西壮族常用药材^[1], 来源于马鞭草科豆腐柴属植物黄毛豆腐柴 *Premna fulva* Craib, 根、茎、叶均可入药, 具有活血散瘀、强筋壮骨、祛风止痛等功效, 该种主要分布于我国的广西西南部、云南南部及贵州南部^[2]。目前, 对战骨的研究主要集中在生药学、化学成分、药理作用等方面^[3-4], 尚未见有关战骨遗传多样性方面的研究报道。ISSR 是 Zietkiewicz 等^[5]于 1994 年提出的一种分子标记技术。ISSR 集 RAPD、SSR 技术的优点于一身, 实验操作

简单、快速、耗资少, 遗传多态性高, 已广泛应用于作物遗传多样性、种群亲缘关系分析等方面^[6-8]。本研究采用 ISSR 分析技术从 DNA 水平分析了战骨的遗传多样性, 为合理地保护、利用与开发战骨资源提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品于 2008 年 9 月采集, 采集数量及其分布地情况见表 1。选取生长健壮、无病虫害的植株, 采

收稿日期: 2012-04-15

基金项目: 广西科技攻关项目 (桂科重 1298001-1-5); 广西自然科学基金项目 (0991227); 广西科技创新能力建设项目 (0992028-10); 广西植物研究所基本业务费项目 (桂植业 12011)

作者简介: 熊忠臣 (1967—), 男, 汉族, 广西桂林阳朔人, 硕士, 副研究员, 主要从事园林绿化和药用植物引种驯化研究。

Tel: 13907738213 E-mail: xzc@gxib.cn

*通讯作者 韦记青 Tel: 13978353916 E-mail: weijq@gxib.cn

网络出版时间: 2012-09-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120906.1612.001.html>

表 1 材料信息

Table 1 Information of samples

编号	采集地	样本数	海拔 / m	土壤类型	生 境	植被类型
LZ	广西龙州县	18	295	棕色石灰土	疏林边缘	稀树灌丛
NM	广西南明县	18	170	棕色石灰土	石山山脚	稀树灌丛
FS	广西扶绥县	18	193	黑色石灰土	石山山脚	藤刺灌丛
TY	广西田阳县	18	430	棕色石灰土	山谷中部	灌丛
PG	广西平果县	18	224	黑色石灰土	石山中下部	稀树灌丛
LL	广西隆林县	18	864	棕色石灰土	坡中下部	灌草丛
TE	广西天峨县	18	321	黑色石灰土	石山中下部	稀树灌丛
YN	云南西双版纳	18	1 152	红壤	土山中下部	常绿阔叶林
GZ	贵州罗甸县	18	370	红壤	土山中下部	次生林

集当年萌发的幼嫩叶片，硅胶干燥后置于低温干燥处保存。样品经广西植物研究所韦霄研究员鉴定为黄毛豆腐柴 *Premna fulva* Craib.。

引物、 Mg^{2+} 、dNTP、 $10\times$ PCR 缓冲液、Taq DNA 聚合酶购于上海生工生物工程技术有限公司； λ -EcoT14 I Digest DNA Marker 购于华美生物工程公司；三氯甲烷、异丙醇、乙醇、三水合乙酸钠购于西陇化工股份有限公司。

1.2 仪器

TU—1901 型双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；PCR 仪（美国 BIO-RAD 伯乐公司）；DYCP—34 型电泳槽（北京市六一仪器厂）；离心机（珠海黑马医学仪器有限公司）；CDYY—6C 型电泳仪（北京市六一仪器厂）；UVP 凝胶成像系统。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法^[9]提取战骨总 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检验 DNA 质量，紫外分光光度计检测 DNA 质量浓度，稀释至 30 ng/ μ L。

2.2 PCR 反应体系与扩增程序

反应体系：25 μ L 的体系中含 Mg^{2+} 2.0 mmol/L，dNTP 0.2 mmol/L，Taq DNA 聚合酶 1.0 U，引物 0.8 μ mol/L，模板 DNA 50 ng， $10\times$ Buffer 2.5 μ L，超纯水补至 25 μ L。扩增程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，52 $^{\circ}$ C 退火 40 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min，45 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min，4 $^{\circ}$ C 保存^[10]。

2.3 电泳检测

取 5 μ L PCR 扩增产物，加 2 μ L 溴酚蓝混匀，1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1.5 h 左右，当溴酚蓝指示剂

距离琼脂糖凝胶前沿约 2~3 cm 时停止电泳。EB 液（0.5 μ L/mL）中染色 20 min，然后置于 UVP 凝胶成像系统中拍照、记录。

2.4 数据统计与分析

用扩增产物的统计结果建立 ISSR 数据库^[11]，电泳图中有带的记为“1”，无带的记为“0”，形成 0/1 矩阵。用 Popgene 1.31 软件计算多态位点百分率、基因流、遗传距离等。采用 NTSYS 2.1 软件对战骨种群进行聚类分析。

3 结果

3.1 扩增产物的多态性

用筛选出的 13 个能扩增出清晰、重复性好的条带的引物对 9 个战骨种群进行 ISSR-PCR 扩增，计算多态位点百分率（PPL）结果见表 2。13 个引物

表 2 战骨 ISSR 扩增结果

Table 2 ISSR amplification of *P. fulva*

引物	核苷酸序列 (5'~3')	总带	多态性带数	PPL / %
807	Ag Ag Ag Ag Ag Ag Ag AgT	5	4	80
826	AC AC AC AC AC AC AC ACC	6	6	100
827	AC AC AC AC AC AC AC ACg	6	6	100
834	Ag Ag Ag Ag Ag Ag Ag AgYT	5	5	100
836	Ag Ag Ag Ag Ag Ag Ag AgYA	5	4	80
840	gA gA gA gA gA gA gAYT	6	4	66.67
843	CT CT CT CT CT CT CT CTRA	7	6	85.71
845	CT CT CT CT CT CT CT CTRg	5	5	100
846	CA CA CA CA CA CA CA CART	5	5	100
848	CA CA CA CA CA CA CA CARg	6	5	83.33
855	AC AC AC AC AC AC AC ACYT	7	7	100
856	AC AC AC AC AC AC AC ACYA	5	4	80
868	gAA gAA gAA gAA gAA gAA	5	4	80
总计		73	65	89.04

共扩增出 73 条带, 65 条为多态性带, 多态性条带占总数的 89.04%。每个引物可扩增出 4~7 条带, 平均每个引物 5.6 条带, 5 条多态带。13 个引物中, 6 个引物的多态性条带为 100%, 占引物总数的 46.15%。

3.2 种群的遗传多样性

9 个种群中, TY 多态位点数最多, 为 36 个, 种群 PPL 为 49.32%; GZ 多态位点最少, 为 25 个, 种群 PPL 为 34.25%。各种群的平均多态位点数和 PPL 分别为 32、44.45%。在物种水平上, 等位基因数 (N_a) 为 1.890 4, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.361 3, Nei's

基因多样性指数 (H) 为 0.226 5, Shannon's 多样性信息指数 (I) 为 0.357 2。在种群水平上, 各个种群的 I 平均为 0.221 9, H 为 0.147 6。 H 的范围为 0.005 7~0.180 5, NM 种群的 H 最高, 为 0.180 5, 其次是 PG, 为 0.168 4, 最低的是 LZ, 为 0.115 7; I 的范围是 0.176 6~0.267 1, NM、PG 种群的 I 较大, 分别是 0.267 1、0.252 0, 其余种群的 I 大小顺序是 TY>TE>FS>LL>YN>LZ>GZ。 H 和 I 所表现出的规律基本一致: NM、PG、TY、TE 4 个种群的遗传多样性较高, LZ、GZ 等 5 个种群遗传多样性较低, 见表 3。

表 3 战骨种群的遗传变异
Table 3 Genetic variance of *P. fulva* populations

种群	多态位点数	PPL / %	N_a	N_e	H	I
FS	34	46.58	1.465 8	1.256 9	0.150 4	0.227 1
NM	36	49.32	1.493 2	1.316 9	0.180 5	0.267 1
PG	35	47.95	1.479 5	1.286 2	0.168 4	0.252 0
TE	35	47.95	1.479 5	1.252 3	0.151 1	0.230 3
LL	30	41.10	1.411 0	1.249 6	0.141 1	0.209 6
GZ	25	34.25	1.342 5	1.215 6	0.119 6	0.176 6
LZ	31	42.47	1.424 7	1.186 3	0.115 7	0.181 3
TY	36	49.32	1.493 2	1.289 3	0.168 0	0.251 6
YN	30	41.10	1.411 0	1.224 7	0.133 4	0.201 8
平均	32	44.45	1.444 5	1.253 1	0.147 6	0.221 9
物种水平	65	89.04	1.890 4	1.361 3	0.226 5	0.357 2

3.3 种群的遗传分化

Wright 等^[12]认为, 种群的基因多样性可分解为种群内基因多样性 (H_s) 和种群间基因多样性 (D_{st})。战骨总的基因多样性 (H_t) 为 0.226 5, H_s 和 D_{st} 分别为 0.078 9、0.147 6, 种群间基因分化系数 (G_{st}) 为 0.348 4, H_s 和 D_{st} 分别占 H_t 的 65.17%、34.84%, 战骨种群内遗传变异大于种群间遗传变异; 战骨种群的平均基因流 (N_m) 为 0.935 1, 表明各种群之间的基因流动水平较低。

3.4 种群遗传距离和遗传一致度

从遗传距离来看, TE 与 GZ 种群间的遗传距离最小, 为 0.039 7, 遗传距离较小的还有 GZ 和 LL、TE 和 LL, 遗传距离最大的是 PG 和 LL。种群在遗传一致度方面的表现为 GZ 与 TE 间的遗传一致度最高, 为 0.961 1, 其次是 LL 和 TE、GZ 和 LL、LL 和 PG 间的遗传一致度最低, 见表 4。基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 法构建各种群遗传关系聚类图 (图 1)。结果显示, 9 个种群明显可分为两组, FS、NM、PG、

表 4 战骨种群遗传距离 (对角线以下) 和遗传一致度 (对角线以上)
Table 4 Genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) of *P. fulva* populations

种群	FS	NM	PG	TE	LL	GZ	LZ	TY	YN
FS		0.930 7	0.916 2	0.917 1	0.841 2	0.882 7	0.919 7	0.902 0	0.899 4
NM	0.071 8		0.923 0	0.912 5	0.848 0	0.889 1	0.919 2	0.883 3	0.854 4
PG	0.087 5	0.080 1		0.915 5	0.832 2	0.890 7	0.895 2	0.888 3	0.874 3
TE	0.086 6	0.091 5	0.088 2		0.937 3	0.961 1	0.909 5	0.912 5	0.923 7
LL	0.172 9	0.164 9	0.183 7	0.064 7		0.934 1	0.855 0	0.896 6	0.878 7
GZ	0.124 7	0.117 6	0.115 8	0.039 7	0.068 1		0.900 9	0.918 1	0.889 4
LZ	0.083 7	0.084 3	0.110 7	0.094 9	0.156 6	0.104 4		0.873 4	0.835 2
TY	0.103 1	0.124 1	0.118 5	0.091 6	0.109 2	0.085 5	0.135 4		0.897 3
YN	0.106 0	0.157 4	0.134 4	0.079 4	0.129 4	0.117 3	0.180 0	0.108 4	

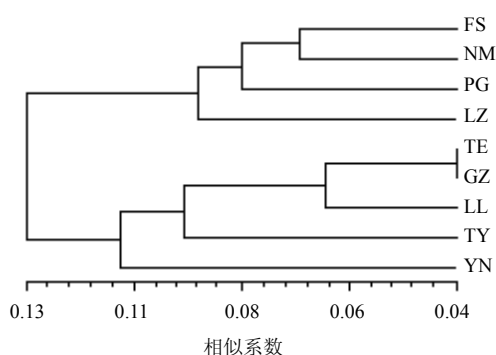


图1 战骨遗传距离树状图

Fig. 1 Dendrogram of *P. fulva* genetic distance

LZ 为一组; TE、GZ、LL、TY、YN 为一组。

4 讨论

Nybom^[13]对 307 个物种的遗传多样性研究结果表明, 所调查的多年生植物、广布种、异交种群水平的 I 的平均值分别为 0.25、0.22 和 0.27。根据统计, 双子叶植物、多年生短寿植物、狭域分布种、异交植物和重力散播种子的物种种群水平的平均 H 为 0.191、0.20、0.28、0.27、0.19^[14]。战骨 I 、 H 平均为 0.221 9 和 0.147 6, 低于以上植物遗传多样性的平均值, 表明战骨种群遗传多样性为中等偏低水平。

Hamrick 等^[15]认为地理分布在一定程度上决定着植物遗传多样性的高低, 繁育系统是在种群水平上影响遗传多样性的主要因素。一般来说, 分布区较广的物种常具有更高的遗传多样性水平^[16], 稀有的或分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[17]。在我国, 战骨分布于广西西南部、云南南部及贵州南部的部分地区。目前所知, 战骨在广西分布于西南的崇左(包括宁明县、扶绥县、龙州县、大新县)、西部的百色(包括平果县、田阳县、隆林县、田东县)、西北的河池(包括天峨县)3 个市中的 9 个县, 其他市尚未发现^[18]。战骨多分布于石山山脚或石山的中下部, 石山间常间隔有土山、道路或田地, 难以形成连续的分布区域。生境片段化是一个面积大而连续的生境缩小并分割成两个或更多小块的过程, 最终形成生物地理学中的“岛屿”。岛屿化常发生在生境面积急剧减少的情况下。但是, 如果原有生境被公路、铁路、篱笆或限制生物自由活动的其他障碍物分开, 即使生境面积减少程度很小, 也会发生生境岛屿化^[19]。片段化的生境使战骨扩散以及群落的建立受到限制, 对战骨的正常散布产生直接障碍。生境的片段化还加速了战骨种群数量的下降和灭绝。种群被分成几个小种群后, 由于交配困难,

遗传漂变和其他问题变得更加脆弱。

战骨为灌木, 需较多年限才可开花结果, 野外调查中见到的可结实的成年植株较少。成年战骨结实量大, 一株可达数万粒, 但叶片的光合产物供应有限, 致使果实细小、大小不一、品质差。果实有坚硬的内果皮且含有的种子数较多, 种子贮藏的营养物质少、体积小, 发育不充实, 生活力较低。果实成熟后落于母株附近的岩石或土层的表面, 此时其分布地温度高、光照强、较干旱, 自然条件下战骨种子发芽率很低^[20]。故战骨繁殖率低, 遗传物质交换和重组的机会较少, 致使产生变异的概率减小。

野外调查中发现, 战骨分布最多的区域是温度较高的 LZ、NM 一带, 随着分布区的纬度增高, 温度逐渐降低, 战骨的丰富程度逐渐减少^[18]。9 个种群的遗传多样性大小表现为 $NM > TY > TE > PG > FS > LZ > LL > YN > GZ$ 。湿热地区的遗传多样性水平稍微偏高, 这可能主要和战骨偏好相对湿热气候的生活习性相关。

战骨种群的总基因多样性 H_t 为 0.226 5, 种群内基因多样性占种群基因多样性的 65.17%, 34.84% 变异存在于种群间, 种群间基因分化系数 G_{st} 为 0.348 4, 种群的平均 N_m (0.935 1) 远低于一般广布种植物的 N_m (1.881)^[21], 表明战骨种群内遗传变异大于种群间遗传变异, 种群间的 N_m 基本正常, 但 N_m 不是很高, 种群间出现了一定程度的遗传分化。种群间遗传分化的产生与种群间的基因交流受到限制有关。在植物中, 花粉、种子的扩散和传播是基因流的两种主要形式^[22], 战骨种群间相距较远, 花粉和种子难以在种群间有效的传播, 战骨远距离基因交流的可能性较小。

战骨种群间遗传距离聚类结果显示, 9 个种群明显可分为两组: FS、NM、PG、LZ 为一组; TE、GZ、LL、TY、YN 为一组。地理上较近的种群聚在一起, 这与其地理分布格局大致吻合。战骨种群间的基因流受到一定程度的限制, 但地理位置相近的种群间基因交流的可能性较大, 因而能保持较小的遗传距离。

综上所述, 战骨生境的片段化以及战骨自身的生物学特性是战骨种群遗传多样性较低的主要原因。物种的遗传多样性水平在一定程度上可以体现该物种适应环境的能力, 制约物种适应性进化的水平, 同时物种的遗传多样性水平也可为其现状和保护价值的评估及迁地保护等措施的提出提供重要的

信息^[23]。宁明、田阳和天峨种群具有较高的遗传多样性,建议将其作为优先保护和利用的种群。同时,注意其他地区战骨的保护与利用,加强战骨良种选育、引种驯化和种群内优良单株的选择等方面的研究。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992.
- [2] 陈丽芬, 黄琼, 林翠梧, 等. 紫外分光光度法测定战骨中总黄酮的含量 [J]. 广西轻工业, 2008, 110: 24-27.
- [3] 韦记青, 石天松, 蒋运生, 等. 壮药战骨综合研究分析 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 965-966.
- [4] 戴春燕, 陈光英, 朱国元, 等. 战骨茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 34-35.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) 2 anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176.
- [6] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [7] 张忠廉, 李学兰, 张丽霞, 等. 叶下珠种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 159-163.
- [8] 张忠廉, 唐德英, 张丽霞, 等. 珠子草遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2125-2129.
- [9] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [10] 史艳财, 邹蓉, 孔德鑫, 等. 战骨 ISSR-PCR 反应条件的筛选与优化 [J]. 种子, 2011, 30(7): 31-34.
- [11] 黄捷, 陈晓斌, 叶兰花, 等. 16 份黄秋葵种质的 ISSR 分析 [J]. 热带农业科学, 2008, 24(5): 403-408.
- [12] Wright S. Evolution in Mendelian population [J]. *Genetic*, 1931, 16: 97-159.
- [13] Nybom H D. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1143-1155.
- [14] 赵楠, 李宏庆. 地黄居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 河南科学, 2009, 27(11): 1386-1391.
- [15] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, *et al.* *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland: Sinauer, 1990.
- [16] Korron J D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners [J]. *Ecology*, 1987, 1: 47-58.
- [17] 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.
- [18] 韦记青, 史艳财, 蒋运生, 等. 广西战骨种质资源调查研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 2041-2044.
- [19] 迟德富, 孙凡, 严善春, 等. 保护生物学 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2005.
- [20] 史艳财, 韦记青, 唐辉, 等. 战骨种子萌发特性研究 [J]. 种子, 2011, 30(2): 69-71.
- [21] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations [A]. Urbanska K. *Differentiation Patterns in Higher Plants* [C]. New York: Academic Press, 1987.
- [22] 金则新, 李钧敏, 李建辉. 木荷种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 3(3): 271-276.
- [23] Hogbin P M, Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate* [J]. *Conserv Biol*, 1999, 13(3): 514-522.