

• 药材与资源 •

河南益母草野生居群遗传多样性的 SCoT 分析

张维瑞¹, 韩远记², 薛愧玲¹, 袁王俊¹, 尚富德^{2*}

1. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004

2. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004

摘要: 目的 研究河南益母草野生居群遗传多样性。方法 利用 SCoT 分子标记对位于河南伏牛、太行、大别和桐柏 4 大山脉的 8 个益母草居群 66 个样品进行遗传多样性分析。结果 10 对引物共扩增出 240 条带, 其中多态性条带为 238 条, 多态性百分率 (PPB) 为 99.17%。Nei's 遗传多样性指数 (H) 平均值为 0.264 2, Shannon's 多态性信息指数 (I) 平均值为 0.39, 遗传分化系数 (Gst) 为 0.294 6, 种群间基因流为 1.197。Mantel Test 分析表明, 河南益母草居群间的亲缘关系与它们之间的地理距离有着明显的相关性 ($r=0.366\ 3$, $P<0.05$)。结论 河南野生益母草种群具有较高的遗传多样性, 其遗传距离与地理距离存在明显的相关性。

关键词: 益母草; 遗传多样性; Nei's 遗传多样性指数; 遗传分化系数; 基因流

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-1022-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.020

SCoT analysis on genetic diversity among wild populations of *Leonurus artemisia* in Henan provinceZHANG Wei-rui¹, HAN Yuan-ji², XUE Kui-ling¹, YUAN Wang-jun¹, SHANG Fu-de²

1. Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity among the wild populations of *Leonurus artemisia* in Henan province.

Methods The genetic diversity of 66 individuals in eight representational populations of *L. artemisia* from four areas of Funiu, Taihang, Dabie, and Tongbai Mountains was investigated by SCoT molecular marker technique. **Results** A total of 240 bands were produced by 10 primers, among which 238 bands were polymorphic bands, and the percentage of polymorphic bands (PPB) was 99.17%. The average value of Nei's genetic diversity index (H) was 0.264 2, Shannon's information index (I) was 0.39, genetic differentiation coefficient (Gst) was 0.294 6, and the gene flow (Nm) among populations was 1.197. Mantel Test analysis showed that the significant correlation was found between the geographical and genetic distances among the different populations of *L. artemisia* ($r=0.366\ 3$, $P<0.05$). **Conclusion** The wild populations of *L. artemisia* in Henan province have higher genetic diversity. There is a significant correlation between geographical and genetic distances.

Key words: *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu; genetic diversity; Nei's genetic diversity index; genetic differentiation coefficient; gene flow

益母草 *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu 为唇形科 (Lamiaceae) 益母草属植物。其地上部分入药称益母草, 具有活血调经、利尿消肿、清热解毒等功效, 用于月经不调、痛经经闭、恶露不尽、水肿尿少、疮疡肿毒; 果实入药称为茺蔚子, 具活血调经、清肝明目作用, 用于月经不调、经闭痛经、目赤翳障、头晕胀痛^[1]。

遗传多样性是每个物种或种群所固有的特性, 其遗传多样性越丰富, 其生命力就越顽强, 反之则弱。因此, 在遗传多样性研究指导下对种质资源的收集、保存、评价和利用, 不仅可以掌握种质资源多样性状况、遗传背景, 制定可持续开发利用的方案, 为合理保护与科学利用种质资源提供科学依据^[2]。

益母草遗传多样性方面的研究非常少。陈建华

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30971076); 河南省高校创新人才基金资助项目 (094100510018)

作者简介: 张维瑞 (1972—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为药用植物资源。E-mail: yuanwangjun@henu.edu.cn

*通信作者 尚富德, 教授, 博士生导师。E-mail: fudeshang@henu.edu.cn

等^[3]用 RAPD 分子标记对浙江省及其邻近地区益母草 7 个居群的基因组 DNA 进行了研究, 结果认为遗传分化与其地理分布有一定的联系。余琪等^[4]利用 AFLP 分子标记研究了来自 9 个产地各一份地方品系益母草的遗传多样性, 结果认为益母草种质间存在较为丰富的遗传多样性。陈丽雅等^[5]对浙江、江西、云南等 9 个省 19 个种源研究结果表明, 益母草种源间存在明显的遗传差异, 其遗传变异与地理分布存在显著的相关性, 地理位置接近的种源遗传性状较为接近。

SCoT 分子标记结合 RAPD 标记和 ISSR 标记的优点, 操作简单, 成本低廉, 多态性丰富, 尤其是能有效地产生与性状联系的标记, 是一种能跟踪性状的新的分子标记, 有利于分子辅助育种^[6-7]。

河南地形复杂, 地势西高东低。北部为太行山余脉, 西部为秦岭余脉, 南部为大别山脉、桐柏山脉, 中南部自西北向东南横亘 400 km 的伏牛山脉。气候属于南北过渡性气候。河南益母草资源丰富, 且质量非常好, 但目前未见河南益母草野生资源遗传多样性的报道。本实验利用 SCoT 分子标记技术研究了河南 8 个益母草野生居群的遗传多样性, 掌握河南益母草遗传多样性和个体间的亲缘关系, 为资源的保护和开展育种工作提供依据。

1 材料

益母草采自河南伏牛、太行、大别、桐柏山区 8 个野生种群, 栾川、南阳、内乡、鲁山、方城 5 个居群共 45 批样品均属于伏牛山区, 罗山居群共 7 批样品属于大别山区, 焦作居群 6 批样品属于太行山区, 桐柏居群 8 批样品属于桐柏山区。采样时个体间距保持 50 m 以上, 采取嫩叶放在保鲜袋中, 用变性硅胶干燥, 带回实验室后置于 -70 °C 超低温冰箱中保存备用, 样品由河南大学药学院袁王俊博士鉴定, 均为唇形科植物益母草 *Leonurus artemisia* (Lour.) S. Y. Hu。

高速台式离心机为 SIGMA1-14K(德国 Eppendorf 公司), PCR 仪为 PTC-100(美国 MJ Research 公司)。

2 方法

2.1 引物筛选与 PCR 扩增

使用宝生物工程(大连)有限公司植物基因组 DNA 抽提试剂盒(DV811A)提取益母草基因组 DNA, 操作流程按试剂盒说明书进行。以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

SCoT 引物参照 Collard 等^[6]所列出的引物, 合成在北京三博远志公司。通过预实验从 70 对引物中筛选出 10 对能稳定扩增且背景清晰的引物, 见表 1。

表 1 筛选出的引物和退火温度

Table 1 Screened primers and annealing temperatures

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 / °C
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	52
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	52
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	52
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	52
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	58
SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA	58
SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT	52
SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA	58
SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA	58
SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC	52

SCoT-PCR 的最佳反应体系为: 预变性 94 °C, 3 min; 变性 94 °C, 1 min, 退火 1 min, 延伸 72 °C, 2 min, 共 35 个循环; 再延伸 72 °C, 5 min; 最后 4 °C 保存, 取出后放在 4 °C 冰箱中保存, 以备检测。

产物在 5.0% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 点样 3 μL (含 0.5 μL 点样缓冲液)。电泳缓冲液为 1×TBE, 稳压 120 V, 溴酚蓝距凝胶边缘 2~3 cm 处停止电泳, 电泳后银染并照相。

2.2 数据统计与分析

对 SCoT 扩增清晰可辨的条带进行统计, 根据条带的有无计数, 有带计为“1”, 无带或模糊不清的计为“0”, 在 Excel 中形成 0/1 数据。利用 POPGENE1.32 软件计算多态位点数、多态性位点百分率(PPB)、Nei's 遗传多样性指数(H)、Shannon's 多态性信息指数(Shannon's information index, I)、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m), 并根据种群间的遗传距离, 采用非加权组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)进行居群间聚类。用 GenAlEx 6.41 对其进行分子变异分析。利用 POPGENE 计算出来的遗传距离数据整理成所需的数据输入格式, 然后用软件 IBDWS 3.15 分析遗传分化与地理距离的相关性。

3 结果与分析

3.1 SCoT 扩增结果的遗传多样性分析

从 70 条 SCoT 引物中共筛选出 10 条用于 PCR 扩增, 扩增条带从 200~2 000 bp 不等, 见图 1。共扩出 240 条条带, 其中多态性条带 238 条, 多态性条带占 99.17%。多态性条带最多的居群为栾川居群, 有 219 条, 多态性百分率高达 91.25%; 鲁山居

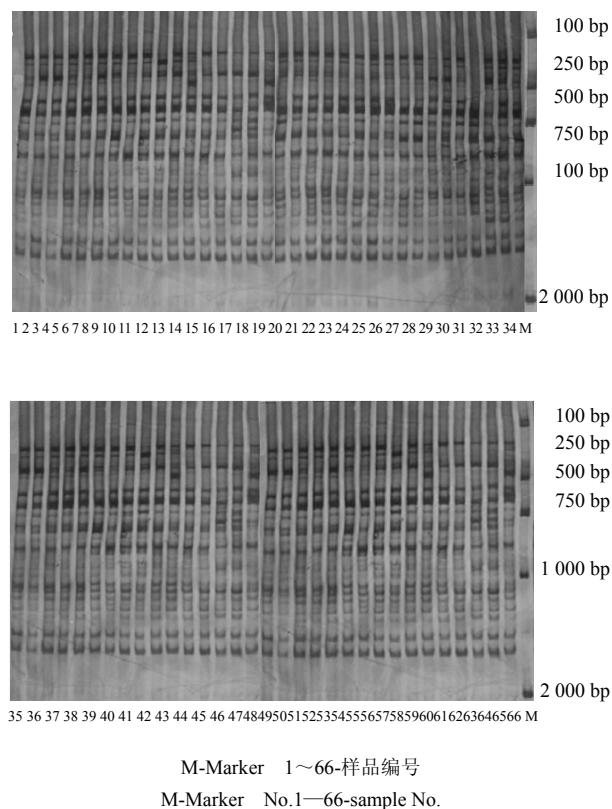


图1 引物 SCoT6 对 66 个益母草个体的电泳图
Fig. 1 Electropherogram of Primer SCoT6 to 66 samples of *L. artemisia*

表2 益母草种群 SCoT 遗传多样性分析

Table 2 SCoT genetic diversity among populations of *L. artemisia*

居群	样品数	多态位点数	PPB / %	<i>H</i>	<i>I</i>
栾川	15	219	91.25	0.317 2	0.476 3
南阳	6	167	69.58	0.269 2	0.397 4
方城	6	169	70.42	0.269 7	0.399 2
内乡	7	174	72.50	0.284 4	0.418 0
鲁山	11	217	90.42	0.345 9	0.509 7
罗山	7	138	57.50	0.213 9	0.318 5
桐柏	8	142	59.17	0.208 6	0.313 9
焦作	6	127	52.92	0.204 4	0.302 0

表3 益母草群体分子变异分析
Table 3 Molecular variation analysis on *L. artemisia* populations

变异来源	自由度	平均方差	变异分量	变异百分比 / %
居群间	7	111.94	9.181	19.6
局群内	58	37.61	37.611	80.4
总体水平	65	96.292	1.592 08	

群多态性条带为 127 条,多态百分率为 90.42%;多态性条带最少的焦作居群仅有 126 条,多态性百分率仅为 52.92%;伏牛山区 5 个居群的多态性条带均高于其余 3 个山区,最低的南阳居群多态性位点为 69.58%,而桐柏山区仅为 59.17%。见表 2。

Nei's 基因多样性平均指数是衡量群体遗传多样性的指标。在本研究中, H 为 0.204 4~0.345 9,平均值为 0.264 2,显示益母草在物种水平上的遗传多样性较为丰富,居群间的差异也较大。 I 为 0.302 0~0.509 7,平均值为 0.39。由表 2 可见,益母草具有较高的遗传多样性水平,其中来自桐柏、太行、大别山区的三个居群的两个参数均低于平均值。 H 和 I 的大小与各居群多态位点百分率的高低趋势基本一致,鲁山居群最高,其次为栾川居群,为 0.317 2 和 0.476 3。居群间的 G_{st} 为 0.294 6, N_m 为 1.197 0。

3.2 分子变异分析

分子变异分析表明,河南 8 个益母草野生居群间的遗传变异为仅为 19.6%,而居群内的变异为 80.4%,表明其遗传变异主要发生在居群内(表 3)。

3.3 益母草遗传距离和遗传关系

遗传距离指标可以说明各居群间彼此关系的远近。益母草 8 个居群间的遗传距离范围在 0.076 1~0.286 3(表 4),其中遗传距离最小的是罗山居群与

桐柏居群的遗传距离为 0.076 1,其次为栾川居群和鲁山居群,其遗传距离为 0.094 1;遗传距离最大的为南阳居群和焦作居群,其遗传距离为 0.286 3,其次为焦作居群与方城居群,其遗传距离为 0.283 5。这些与居群间的实际距离有较高的吻合度,南阳与方城的地理距离最近,仅为 53.7 km,其遗传距离为 0.109 4;地理距离最远的罗山与内乡的实际距离为

620.9 km, 而二者之间的遗传距离为 0.220 1。根据居群间的遗传距离, 运用 UPGMA 方法进行聚类分析。从图 2 来看, 来自伏牛山区的 5 个居群首先聚在一起; 其次, 来自大别山的罗山居群和来自桐柏山区的桐柏居群聚在一起, 然后又与来自太行山区的焦作居群聚在一起, 从总体上看, 其聚类情况与地理位置有很大的关系。在整个伏牛山区几个居群形成的大枝内, 南阳居群与方城居群聚在一起, 这点也与地理距离相一致, 栾川居群与鲁山居群首先聚在一起, 然后与内乡居群聚在一起, 这一聚类结果与地理距离不一致。

表 4 基于 SCoT 的 8 个益母草居群的 Nei's 遗传距离

Table 4 Nei's genetic distance of eight *L. artemisia* populations based on SCoT data

居群	栾川	南阳	方城	内乡	鲁山	罗山	桐柏	焦作
栾川	—							
南阳	0.126 9	—						
方城	0.116 4	0.109 4	—					
内乡	0.123 3	0.151 5	0.121 3	—				
鲁山	0.094 1	0.138 7	0.139 3	0.122 7	—			
罗山	0.158 7	0.230 5	0.209 0	0.220 1	0.190 0	—		
桐柏	0.193 9	0.240 8	0.245 0	0.261 4	0.216 6	0.076 1	—	
焦作	0.231 1	0.286 3	0.283 5	0.279 6	0.245 6	0.163 8	0.130 1	—

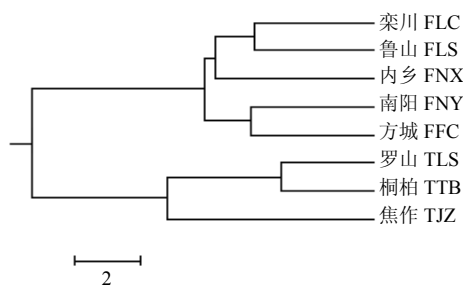


图 2 益母草 8 个居群聚类图

Fig. 2 Dendrogram of eight populations of *L. artemisia*

为了进一步分析遗传距离与地理距离之间的关系, 本实验利用 POPGENE 计算出来的遗传距离数据和用 Google 地图计算出的地理距离, 采用在线软件 IBDWS 3.15 进行分析, 从而得出遗传分化与地理距离的相关性。结果发现, 居群间的遗传距离与地理距离有明显的相关性 ($r=0.366\ 3$, $P<0.05$) (图 3)。

4 讨论

遗传多样性研究表明, 河南野生居群益母草具有较为丰富的遗传多样性。Nei's 遗传多样性平均指

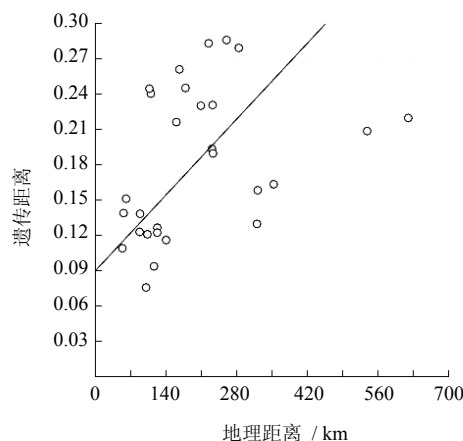


图 3 地理距离和遗传距离的关系图

Fig. 3 Relationship between geographic and genetic distances

数是衡量群体遗传多样性的指标, 本研究 8 个居群 H 平均值为 0.264 2, 尤其是鲁山居群其 Nei's 遗传多样性指数最高, 为 0.345 9。8 个居群平均 I 为 0.39, 其中鲁山居群的 Shannon's 多态性信息指数高达 0.509 7。陈丽雅等^[5]用 20 对 ISSR 引物, 研究了 19 个种源的益母草的遗传多样性, 结果表明, 益母草种源间存在明显的遗传差异, 其遗传变异与地理分布存在显著的相关性, 地理位置接近的种源遗传性状较为接近。余琪等^[4]通过对 9 份益母草种质资源的 AFLP 分析, 益母草种质资源有丰富的遗传多样性。河南 8 个益母草野生居群间的基因的分化系数为 0.294 6, 说明居群间存在明显的遗传分化。基因流是影响居群内部和居群间遗传变异程度的重要因素, 当 $Gst \leq 0.05$, 表示群体间几乎没有遗传分化, $0.05 < Gst < 0.15$, 表示群体间分化程度中等, $0.15 \leq Gst \leq 0.25$, 表示群体间高度分化。当 $0.15 \leq Gst \leq 0.25$, $Nm < 1$ 时, 存在基因流受阻的情况^[8]。本研究中, 河南 8 个益母草野生居群间 Nm 为 1.197, 略大于 1, 表明各居群间存在明显的基因流。分子变异分析表明, 益母草居群内的遗传变异为 80.4%, 居群间的变异仅为 19.6%, 表明益母草的变异主要存在于居群内, 而居群间的遗传分化较小, 进一步说明河南益母草野生居群间存在交流。

Mantel Test 分析表明, 河南益母草居群间的亲缘关系与它们之间的地理距离有着明显的相关性 ($r=0.366\ 3$, $P<0.05$)。聚类分析也支持这一分析结果, 来自伏牛山区的 5 个居群首先聚在一起; 其次, 来自大别山的罗山居群和来自桐柏山区的桐柏居群聚在一起, 然后又与来自太行山区的焦作

居群聚在一起。

益母草为常用中药,了解其遗传多样性水平和遗传变异的分布对于制定益母草资源保护策略具有重要意义。鉴于益母草遗传多样性主要存在于居群内,在遗传选种工作中,应重点保护遗传多样性较高的居群。同时由于其有效成分主要由数量性状变异决定,引种驯化时应选择遗传特异性强的居群进行引种驯化。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 袁王俊, 张维瑞, 尚富德. 河南产不同居群柴胡遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1166-1169.
- [3] 陈建华, 程磊, 郭水良. 浙江省及其临近地区益母草的 RAPD 分析 [J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2003, 26(4): 384-388.
- [4] 余琪, 沈晓霞, 沈宇峰, 等. 益母草种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1296-1299.
- [5] 陈丽雅, 赵鹂, 白岩. 不同种源益母草遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1343-1345.
- [6] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27: 86-93.
- [7] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654.
- [8] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach [J]. *Cancer Res*, 1967, 27: 209-220.