

河南产不同种群茜草遗传多样性分析

董美芳¹, 袁王俊², 韩远记¹, 尚富德^{1*}

1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004

2. 河南大学 中药研究所, 河南 开封 475004

摘要: 目的 对河南7个野生种群的茜草遗传多样性进行调查, 为茜草野生资源的保护提供科学依据。方法 通过DNA测序技术分析叶绿体基因片段 *psbA-trnH* 遗传变异。结果 *psbA-trnH* 序列共得到40个单倍型(H1~H40), 单倍型多样性指数为 0.9510 ± 0.0013 , 核酸多样性指数为 0.01477 , 遗传分化指数为 0.08153 , 种群间基因流为 2.78 。结论 河南地区野生茜草有很高的遗传多样性, 种群间存在较强的基因流, 种群间分化较小。

关键词: 茜草; 遗传多样性; 单倍型; DNA测序; 基因流

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2600-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.022

Analysis on genetic diversity of *Rubia cordifolia* from various geographical populations in Henan province

DONG Mei-fang¹, YUAN Wang-jun², HAN Yuan-ji¹, SHANG Fu-de¹

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

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

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of *Rubia cordifolia* from seven geographical populations in Henan province, and to provide evidence for the protection of *R. cordifolia* wild resources. **Methods** The autogenous variation of chloroplast gene fragment *psbA-trnH* was analyzed by DNA sequencing technique. **Results** Based on cpDNA data, 40 haplotypes (H1—H40) were identified, the diversity index of haplotype and nucleotide diversity index were 0.951 ± 0.0013 and 0.01477 , respectively. Genetic differentiation index was 0.08153 , and gene flow among populations was 2.78 . **Conclusion** The wild populations of *R. cordifolia* in Henan province have higher genetic diversity in geo-authentic product area than other species. There is less genetic differentiation among populations because of the stronger seed-mediated gene flow.

Key words: *Rubia cordifolia* L.; genetic diversity; haplotype; DNA sequencing; gene flow

茜草 *Rubia cordifolia* L. 为茜草科(Rubiaceae)多年生攀援草本植物, 其干燥根及根茎可以入药, 味苦, 性寒, 具有凉血、祛瘀、止血、通经的功效, 用于治疗吐血、衄血、崩漏、外伤出血、瘀阻经闭、关节痹痛、跌扑肿痛^[1]。现代药理研究表明, 茜草具有抗菌消炎、抗癌、抗氧化、保肝、调节免疫力、解热镇痛等作用^[2-8], 且由于其具有蒽醌单体, 而成为抗肿瘤药物的重要资源^[9-10]。以往对茜草的研究主要集中于药理、生化方面, 对其遗传多样性和保护生物学方面的研究尚未见报道。

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分, 是指种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和, 其是每个物种或种群所固有的特性。遗传多样性越丰富, 其生命力就越顽强, 反之则弱。开展遗传多样性研究, 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方案, 为合理保护与科学利用种质提供科学依据^[11]。本实验通过DNA测序技术, 选用叶绿体基因片段 *psbA-trnH* 对河南7个野生茜草种群的遗传变异进行分析, 以期阐明其遗传多样性水平, 为茜草野生资源的保

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970176); 河南省高校青年骨干教师资助计划(2009GGJS-152)

作者简介: 董美芳(1969—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为结构植物学和资源植物学。Tel: (0378)3887799

E-mail: dongmeifang@henu.edu.cn

*通信作者 尚富德 Tel/Fax: (0378)3886199 E-mail: fudeshang@henu.edu.cn

护提供科学依据。

1 材料

采自河南境内 7 个野生种群，其中，龙峪湾、老界岭属于伏牛山区，九莲山和万仙山属于太行山区，桐柏山和大乘山属于桐柏山区，灵山属于大别山区。每个种群随机采集 6~10 个体，个体间距保持 50 m 以上。采集新叶，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。膜叶茜草 *Rubia membranaca* Diels 为外类群。原植物由河南大学生命科学学院董美芳副教授鉴定为茜草 *Rubia cordifolia* L. 干燥根茎。

2 方法

2.1 PCR 扩增与 DNA 测序

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) 提取茜草基因组 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。

扩增所用引物为 *psbA* F 5'-GTTATGCATGAA-CGTAATGCTC-3' 和 *trnH* R 5'-CGCGCATGGTGG-ATTCACAAATC-3'。引物、Taq 聚合酶等均来自上海生工生物工程技术有限公司。扩增反应在 Long Gene MG96 和 PCR 仪上进行，扩增反应体系为 50 μL，反应体系包括 50 ng 基因组 DNA，4 μL 10 mmol/L dNTPs，2 μL 10 mmol/L 的引物，和 2.5 U Taq 酶。PCR 反应扩增程序为 94 °C、4 min，94 °C、1 min，52 °C、45 s，72 °C、1 min，35 个循环，72 °C、8 min。产物送华大基因科技股份有限公司测序。

2.2 数据分析

将所得到的 *psbA-trnH* 序列用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对，并进行适当的人工校正，剪切，

使每条序列前后端对齐。应用 DnaSP version 4.0 软件^[12]对总体水平以及每个种群的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (π) 进行估计，并估算种群间的基因流 (N_m) 与分化系数 (G_{st})。并根据种群间的遗传距离，采用 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行居群间聚类。采用 Arlequin 3.0 软件^[13]中的 AMOVA 进行分子变异分析，计算群体内、群体间的变异方差分布及群体间遗传分化指数 (F_{st})。对茜草进行失配分布分析 (mismatch distribution analysis)，以恒定种群大小为 0 假设，采用 DnaSP version 4.0 软件^[12]进行分析，推测种群是否经历过扩张或瓶颈效应。

3 结果与分析

对来自河南 7 个居群的 62 个茜草个体进行了叶绿体基因片段 *psbA-trnH* 的测序，DNA 序列提交至 GenBank，40 个单倍型序列号为 JQ687226~JQ687265，外类群序列号为 JQ687266。*psbA-trnH* 采用比对后的部分片段，长度为 315 bp，存在 16 个碱基替代位点，40 个单倍型 (H1~H40)。单倍型 H8 个体数最多，有 12 个，其次为单倍型 H1，有 5 个，单倍型 H3 有 3 个，单倍型 H2、H5、H6、H7 个体数为 2 个，其余单倍型均有 1 个。单倍型 H8 分布最广，存在于 4 个种群；单倍型 H3 其次，存在于 2 个种群。根据叶绿体基因数据所得的茜草 h 为 0.951， π 为 0.014 77，龙峪湾种群水平最低，为 0.524，其次为万仙山种群，为 0.844，灵山种群 h 水平最高，为 0.972；九莲山种群 π 水平最低，为 5.370×10^{-3} ，其次为龙峪湾种群，仅为 5.400×10^{-3} ，桐柏山种群 π 水平最高，为 0.020 53。结果见表 1 和 2。

基于 *psbA-trnH* 序列种群间 G_{st} 为 0.081 5，种群

表 1 种群基本信息

Table 1 Information of populations

种群	经度/纬度	样本数	h	π	叶绿体单倍型
龙峪湾	111°45'/33°42'	7	0.524	5.400×10^{-3}	H1、9、10
老界岭	111°20'/33°45'	10	0.933	6.350×10^{-3}	H2、6、8、11、12
桐柏山	113°17'/32°24'	10	0.933	0.020 53	H2、3、4、8、13、14、15
大乘山	112°33'/32°59'	10	0.891	0.015 45	H8、16~22
九莲山	113°32'/35°36'	10	0.933	5.370×10^{-3}	H3、8、23~28
万仙山	113°37'/35°43'	6	0.844	6.350×10^{-3}	H7、29~33
灵山	114°14'/31°53'	9	0.972	0.010 58	H5、34~40

表2 茜草 *psbA-trnH* 片段位点变化产生的40个单倍型
 Table 2 Forty haplotypes induced by variable sites of *psbA-trnH* segment in *R. cordifolia*

单倍型	<i>psbA-trnH</i> 片段位点 / bp															
	62	106	117	148	173	192	236	238	239	254	259	265	269	273	278	286
H1	T	A	T	T	G	A	T	G	A	G	A	G	G	C	G	G
H2	T	G	T	T	G	T	A	G	A	T	T	C	T	G	G	A
H3	T	G	T	G	G	A	T	G	T	T	T	C	T	C	G	A
H4	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H5	T	G	T	T	G	T	A	G	A	T	A	C	G	C	G	G
H6	G	A	T	T	G	T	A	G	A	T	A	C	T	G	G	A
H7	T	A	T	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	C	G	G
H8	T	G	T	A	A	A	T	G	T	T	A	C	T	C	G	A
H9	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H10	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H11	T	A	T	T	G	T	A	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H12	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H13	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H14	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H15	T	A	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H16	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H17	T	A	T	T	A	T	A	G	A	T	A	C	G	C	G	G
H18	T	A	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H19	T	G	T	T	G	A	T	G	A	T	T	C	T	G	G	G
H20	T	G	T	T	G	A	T	G	A	T	T	C	T	G	G	A
H21	T	G	T	T	G	T	A	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H22	T	A	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H23	T	A	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H24	T	G	T	T	G	T	T	G	A	T	A	C	T	G	T	G
H25	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H26	T	G	T	T	G	T	A	G	A	T	T	C	T	G	G	A
H27	T	G	G	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H28	T	G	T	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	C	G	A
H29	T	A	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	G	A
H30	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H31	T	A	T	T	G	T	T	G	A	T	T	C	T	G	G	A
H32	T	G	T	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	C	G	A
H33	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H34	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H35	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H36	T	A	T	T	G	A	A	G	A	T	A	C	G	C	G	G
H37	T	A	T	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	C	G	A
H38	T	G	T	T	G	T	T	G	T	T	T	C	T	G	T	A
H39	T	A	T	T	A	A	A	G	A	T	T	C	T	C	G	G
H40	T	G	T	T	G	A	A	G	A	T	A	C	T	C	G	A

间 N_m 为 2.78。AMOVA 分析结果表明, 茜草群体内的遗传变异 (73.72%) 高于群体间的变异 (26.28%), 见表 3。失配分布分析表明, 结果显著偏离零假设 ($r=0.0082$, $P=0.002$), 种群大小并不恒定, 可能经历过种群的快速扩张或瓶颈效应, 见图 1。

表 3 茜草群体分子变异 AMOVA 分析
Table 3 AMOVA of population molecular variation in *R. cordifolia*

变异来源	自由度	方差组分	变异分量	变异百分率 / %	F 值
居群间	6	44.522	0.638 0	26.28	
居群内	55	98.543	1.791 0	73.72	
总体水平	61	143.065	2.430 4		0.262 8

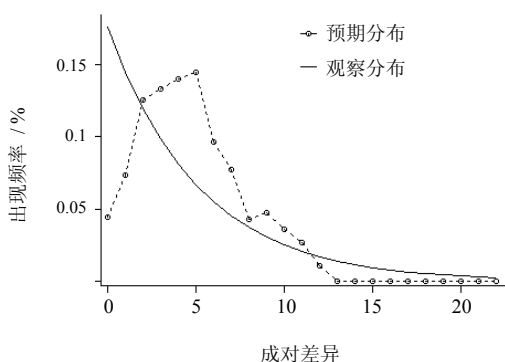


图 1 基于 *psbA-trnH* 序列的茜草的失配分布分析

Fig. 1 Mismatch distribution of *R. cordifolia* calculated from *psbA-trnH* sequence

居群聚类 (图 2) 可见, 大乘山居群和太行山区的万仙山居群首先聚在一起, 然后才与同为桐柏山区的桐柏山居群聚成一个大支, 然后依次为伏牛山区的老界岭和龙峪湾, 大别山区的灵山处于最外侧。说明居群间关系与距离有一定的关系, 但存在遗传关系与距离不一致的情况, 进一步说明了茜草可能经历过种群的快速扩张。

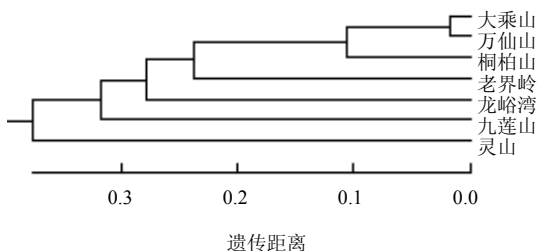


图 2 茜草 7 个居群聚类图

Fig. 2 Dendrogram from seven populations of *R. cordifolia*

4 讨论

遗传多样性是生物所携带遗传信息的总和, 是长期进化的产物。一个种群遗传多样性越高或越丰富, 适应环境的能力就越强。影响植物遗传多样性的因素有很多, 如地理分布范围、繁育系统、种群大小^[14]。异交和混交物种一般会比自交物种有更高的遗传多样性; 地理分布范围广的物种会比分布范围狭窄的物种遗传多样性高; 大的种群会比小种群遗传多样性高。本研究发现, 河南茜草野生种群具有很高的遗传多样性 ($h=0.951$, $\pi=0.01477$)。究其原因, 可能是茜草广布于亚洲北部至澳大利亚, 种群规模很大, 在河南整个地区都很常见。

叶绿体基因数据表明, 茜草种群间有很低的遗传分化 ($Gst=0.0815$)。可能是由于叶绿体基因由种子进行传播, 而成熟的茜草果实为肉果, 果皮甘甜, 可能是鸟类的食物, 其种子靠鸟类进行传播, 其传播距离较远, 所以种群间基因流较高 ($N_m=2.78$)。另外, 失配分布分析结果表明, 其可能经历过快速扩张, 说明可能是从最近同一个祖先基因型快速分化而来。本物种如此多的基因型, 且大多基因型只有 1 个个体, 也进一步说明其可能由于某一历史事件经历了瓶颈效应, 并在瓶颈效应结束后, 进行了快速扩张和分化。同时, 快速的扩张及种群间的基因流, 也使距离隔离效应 (IBD) ($r=0.226$, $P<0.05$) 效应减弱, 地理距离越远, 分化越大。总之, 茜草种群具有非常高的遗传多样性, 可能经历过快速扩张。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王晓建, 黄胜阳. 茜草属植物化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(2): 109-112.
- [3] Wu T S, Lin D M, Shi L S, et al. Cytotoxic anthraquinones from the stems of *Rubia wallichiana* Decne [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(8): 948-950.
- [4] Fan J T, Chen Y S, Xu W Y, et al. Rubiyunnanins A and B, two novel cyclic hexapeptides from *Rubia yunnanensis* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51(52): 6810-6813.
- [5] Manojlovic N T, Solujic S, Sukdolak S, et al. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina* [J]. *Fitoterapia*, 2005, 76(2): 244-246.
- [6] Hitotsuyanagi Y, Ishikawa H, Hasuda T, et al. Isolation, structural elucidation, and synthesis of RA-XVII, a novel

- bicyclic hexapeptide from *Rubia cordifolia*, and the effect of side chain at residue 1 upon the conformation and cytotoxic activity [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 935-938.
- [7] Cai Y Z, Sun M, Xing J, *et al.* Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(26): 7884-7890.
- [8] 冯松杰, 曾安平, 蒋继福, 等. 茜草治疗白细胞减少症 32 例 [J]. 陕西中医, 2000, 21(3): 102.
- [9] Babita H M, Chhaya G, Goldee P. Hepatoprotective activity of *Rubia cordifolia* [J]. *Pharm Online*, 2007, 3: 73-79.
- [10] Kastere S B, Kasture V S, Chopde C T. Anti-inflammatory activity of *Rubia cordifolia* roots [J]. *J Nat Remedies*, 2001, 1(2): 111-115.
- [11] 姚思泰. 当代抑制肿瘤的药物——蒽环类 [J]. 国外医学: 药学分册, 1987, 5(6): 344.
- [12] Sang T C, rawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(8): 1120-1136.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Qiu Y X, Fu C X, Comes H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2011, 59(1): 225-244.