

• 药材与资源 •

基于 SSR 分子标记的滇重楼遗传多样性研究

陈中苏直^{1,2}, 田 波¹, 蔡传涛^{1*}

1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 研究滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 自然居群的遗传多样性, 为滇重楼资源的保护和合理利用提供数据。方法 采用 SSR 分子标记对滇重楼 5 个不同居群共 115 份样品进行遗传多样性分析。结果 筛选出 8 对可用 SSR 引物, 多态位点百分率 (PPB) 为 100%, 多态信息量 (PIC) 为 0.745 6。在居群水平和物种水平上, 观测等位基因数 (N_a) 分别为 8.425 0 和 17.750 0, 有效等位基因数 (N_e) 分别为 4.960 9 和 7.500 7, 观测杂合度 (H_o) 分别为 0.295 5 和 0.294 8, 期望杂合度 (H_e) 分别为 0.654 8 和 0.774 4, Shannon's 信息指数 (I) 分别为 1.520 1 和 2.038 6。遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.172 8, 基因流 (N_m) 为 1.196 6。利用 UPGMA 聚类分析, 将 5 个居群分为 2 类。结论 滇重楼遗传多样性水平较高, 居群内和居群间具有一定的遗传分化。对保护和发展滇重楼资源提出若干措施, 为滇重楼的保护和科学可持续利用提供参考。

关键词: 滇重楼; 遗传多样性; 简单重复序列; 有效等位基因数; 期望杂合度

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)09-1834-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.021

Genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by SSR markerCHEN Zhong-su-zhi^{1,2}, TIAN Bo¹, CAI Chuan-tao¹

1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Kunming 650223, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective The genetic diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* germplasmic resources in natural populations was analyzed by simple sequence repeat marker for protection and rational utilization. **Methods** A total of 115 individuals of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* collected from five natural populations were analyzed by SSR marker for genetic diversity analysis. **Results** Eight pairs of SSR primers were screened. A relatively high level of genetic diversity was revealed: The percentage of polymorphic bands was 100%, the polymorphism information content was 0.745 6. At the population level and species level, the observed number of allele was 8.425 0 and 17.750 0, respectively, the effective number of allele was 4.960 9 and 7.500 7, respectively, the observed heterozygosity was 0.295 5 and 0.294 8, respectively, the expected heterozygosity was 0.654 8 and 0.774 4, respectively, and the Shannon's information index was 1.520 1 and 2.038 6, respectively. The genetic differentiation coefficient was 0.172 8 and the gene flow was 1.196 6. Based on UPGMA cluster analysis, the five populations of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were divided into two clades. **Conclusion** The level of genetic diversity of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was relatively high and there was certain genetic differentiation within and among populations. This study puts forward several suggestions for the protection and development of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* resources, which will be helpful for protection and sustainable utilization of scientific advice and reference. **Key words:** *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; genetic diversity; SSR; effective number of alleles; expected heterozygosity

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 是我国特有的名贵药材, 为百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物。滇重楼

在我国具有悠久的药用历史, 并收录到《中国药典》2015 年版^[1]中, 与重楼属的七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 一起作

收稿日期: 2017-02-24

基金项目: 云南省林业厅科技创新项目 (2016CX02); 云南省科技计划项目科技惠民计划 (2013CA002)

作者简介: 陈中苏直 (1992—), 男, 在读硕士, 研究方向为药用植物栽培。Tel: 15867618135 E-mail: ufortutu123@163.com

*通信作者 蔡传涛 (1964—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为药用植物栽培。Tel: (0871)65161066 E-mail: caict@xtbg.ac.cn

为重楼药材的药典品种。滇重楼以干燥根茎入药，具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效，用于疮痍肿痛、毒蛇咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐，在民间运用广泛，是我国如云南白药、抗病毒颗粒等许多著名中成药的主要成分，具有广阔的开发应用前景^[2]。由于具有较高的药用价值和经济价值，滇重楼的市场需求量与日俱增，野生资源是药材市场上滇重楼的主要来源之一，随着过度采挖以及生境的破坏，滇重楼野生资源日益枯竭，亟待对其现状进行科学合理的评价，并提出科学的保护利用策略。遗传多样性保护是物种保护的重要方向，为了拯救滇重楼野生资源，首先需要对其遗传多样性进行分析。

在植物遗传多样性的研究中，分子标记技术是最有效的手段。简单重复序列（simple sequence repeat, SSR），又称为微卫星 DNA（microsatellite DNA），是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术，近年来应用广泛。相比其他分子标记技术，SSR 具有操作简单、DNA 要求低、基因组里分布广泛、共显性好、重复性高、多态性丰富等特点，在系统发育与进化、植物分子生态、种质资源鉴定和评价等多个领域得到广泛地应用^[3]。SSR 分子标记技术被认为是居群遗传结构分析强有力的工具，能为基因流和亲缘关系的精确测定提供重要参数^[4-5]。目前，对于重楼属植物的遗传多样性研究和分子标

记开发应用方面主要采用 ISSR、AFLP、RAPD、RSAP^[6-9]等分子标记法，利用 SSR 分子标记进行的研究相对较少。

本研究利用 SSR 分子标记技术，对滇重楼 5 个居群的 115 个样品进行了遗传多样性与遗传结构分析，在分子水平上揭示了滇重楼在物种水平和居群水平的遗传多样性以及居群间的遗传关系，为滇重楼野生资源的保护与合理利用提供科学的理论指导。

1 材料与仪器

1.1 样品采集

在云南省内滇重楼分布的不同地域采集 5 个居群一共 115 份样品，每个居群 23 份样品（表 1），均由中国科学院西双版纳热带植物园蔡传涛教授鉴定为滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.。

1.2 仪器与试剂

基因组 DNA 提取试剂盒、ABI PCR 扩增仪、艾本德各量程移液器、配对枪头、国产 96 孔反应板、湘仪 H1650-W 型离心机、湘仪 L550 型离心机、君意电泳仪、君意凝胶成像仪、博日金属浴加热器、ABI 3730 测序仪，-4℃、-20℃冰箱。

琼脂糖、Tris、硼酸、EDTA、ddH₂O、2×Tsing 绿酶、HiDi、GS500Liz 内标等。实验仪器和试剂均由昆明硕擎生物科技有限公司提供。

表 1 滇重楼样品来源

Table 1 Sample sources of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

群体	分布地	样品数	海拔/m	经度 (E)	纬度 (N)
Pop1	景东县景福乡	23	2 059	100°50'29.2"	24°27'06.3"
Pop2	福贡县匹河乡	23	2 326	98°55'46.4"	26°55'38.7"
Pop3	禄劝县撒盘营镇	23	2 300	102°29'43.4"	26°04'05.5"
Pop4	洱源县牛街乡	23	2 558	100°02'54.4"	26°10'10.8"
Pop5	腾冲县滇滩镇	23	1 764	98°25'55.6"	25°28'33.3"

2 方法

2.1 滇重楼 DNA 提取

利用北京百泰克生物技术有限公司生产的新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）提取样品的 DNA，用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳来检测所提取 DNA 的质量和完整性。

2.2 SSR 引物筛选

查阅文献报道^[10-13]，选取重楼属滇重楼和七叶一枝花 SSR 引物，以及由百合 *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker、延龄草 *Trillium tschonoskii*

Maxim.、薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 3 种植物表达序列标签（EST）序列筛选到的滇重楼 EST-SSR 引物，共 46 对（由昆明硕擎生物科技有限公司合成），进行筛选预实验，筛选出 8 对多态性好、稳定性高的引物用于所有样品扩增的正式实验。

2.3 PCR 扩增

2.3.1 PCR 反应体系 设置体系为 15 μL Taq 酶 Mix 7.5 μL，10 pmol/μL 正向引物（加接头）1 μL，10 pmol/μL 反向引物 1 μL，DNA 模板 1 μL，超纯水 ddH₂O 4.5 μL。

2.3.2 PCR 的反应程序 94 °C 预变性 5 min, 4 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s (45~66 °C 因引物而异), 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 °C 持续 10 min, 最后 4 °C 保存。用筛选出的 SSR 引物对所有样品进行 1 次 PCR 扩增之后, 用带荧光的接头引物 (TGTAACGACGGCCAGT) 和正向引物对 1 次扩增的产物进行 2 次扩增 (2 次扩增的条件相同), 上 3730 测序仪进行毛细管电泳。

2.4 数据分析

利用群体遗传学软件 Popgene (Version 1.32)

计算 5 个滇重楼居群的等位基因频率、有效等位基因数 (N_e) 等, 并以基因频率为基础计算杂合度、多态信息量 (PIC) 等; 利用 Population (1.2.28) 软件计算群体间遗传距离 (Nei's 遗传距离) 并构建系统进化树。

3 结果与分析

3.1 引物筛选

根据预实验结果, 从文献报道^[10-13]引物中筛选出多态性较好的 8 对引物用于样品的 PCR 扩增, 所筛选的引物信息见表 2。

表 2 滇重楼 SSR 引物

Table 2 SSR primers of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

引物	序列 (5'→3')	重复单元	产物大小/bp	$T_m/^\circ\text{C}$	文献
2	F: GCACCAATTCTACCACACC R: ACTGGAACGTCCAGCTCGT	(ATC) ₅	202	57	12
6	F: GTATCGACGGTCGCGATTAT R: GTATCGACGGTCGCGATTAT	(CT) ₈	200	57	12
7	F: CATTAGCCGAGAAAGGCTTG R: ACTGGAGCCTCGATCACAAT	(AG) ₈	208	55	12
8	F: GGAGGAAGACGATGATCGAA R: GCCATGTGCAGTCTCTCAAA	(GAG) ₆	208	56	12
BH1	F: AGAAAGCAAGCACAGCGGCG R: CGGTGGAGCCTCCCCATTGC	(GGC) ₁₂	210	60	13
CL3	F: AGCCATCTTCTTCGTTTGGC R: CGAATCAACGGCGAGTGTC	(CT) ₂₀	210	58	11
CL34	F: GGTGACGCCACAAAGAAGAC R: CGTCGTGACCGCCTACTACT	(AG) ₆ ~(AG) ₂₂	178	58	11
PP2	F: TTCTTTCAACCGCCATACCGT R: TGCTTTGCTGCTTCTAACTCG	(GA) ₁₉	196	59	10

3.2 遗传多样性分析

本研究从 46 对引物中筛选出 8 对多态性好、稳定性高、重复性好的 SSR 引物用于 5 个居群共 115 份样品进行 PCR 扩增。多态位点百分率 (PPB) 达到 100%, PIC 为 0.441 9~0.950 9, 平均值 0.745 6。

从表 3 可以看出, 在居群水平上, 等位基因数 (N_a)

为 8.425 0, N_e 为 4.960 9, 观测杂合度 (H_o) 为 0.295 5, 期望杂合度 (H_e) 为 0.654 8, Shannon's 信息指数 (I) 为 1.520 1。在物种水平上, N_a 为 17.750 0, N_e 为 7.500 7, 观测杂合度 (H_o) 为 0.294 8, H_e 为 0.774 4, I 为 2.038 6。由 H_e 和 I 可以得出, 居群 Pop4 的遗传多样性水平最高, 居群 Pop5 的遗传多样性水平最低。

表 3 5 个滇重楼居群 8 对 SSR 引物的观测 N_a 、 N_e 、 H_o 、 H_e 和 I

Table 3 Observed and effective number of allele (N_a , N_e), observed and expected heterozygosity (H_o , H_e), and Shannon's information index of eight SSR primers from five *P. polyphylla* var. *yunnanensis* populations

居群	N_a	N_e	H_o	H_e	I
Pop1	7.750 0 (4.773 4)	3.829 9 (2.988 6)	0.259 0 (0.189 7)	0.595 7 (0.286 1)	1.371 1 (0.794 1)
Pop2	8.875 0 (4.794 0)	5.041 0 (2.648 2)	0.260 7 (0.196 8)	0.717 2 (0.246 0)	1.660 2 (0.737 9)
Pop3	8.750 0 (5.994 0)	5.893 0 (5.068 1)	0.288 5 (0.123 9)	0.681 5 (0.307 1)	1.600 8 (0.901 8)
Pop4	9.625 0 (7.288 7)	6.440 8 (5.877 0)	0.317 7 (0.184 5)	0.710 7 (0.267 9)	1.702 5 (0.919 8)
Pop5	7.125 0 (4.549 3)	3.599 6 (2.617 6)	0.351 5 (0.300 9)	0.568 8 (0.318 2)	1.265 6 (0.808 2)
居群水平	8.425 0 (0.882 5)	4.960 9 (1.113 3)	0.295 5 (0.035 3)	0.654 8 (0.061 0)	1.520 1 (0.191 3)
物种水平	17.750 0 (12.747 5)	7.500 7 (6.166 5)	0.294 8 (0.138 1)	0.774 4 (0.179 2)	2.038 6 (0.846 3)

括号内数据为标准误差

Standard deviation is in brackets

3.3 居群的遗传分化和基因流

根据 Popgene 分析结果表明, 滇重楼居群间存在着一定的遗传分化, 居群间遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.172 8, 说明 5 个滇重楼居群的近交程度较高, 居群之间的遗传变异占 17.28%, 而 82.72% 的遗传变异是由居群内个体间的差异所引起的。

基于 F_{st} 值来计算的基因流 [$N_m = 0.25(1 - F_{st}) / F_{st}$] 为 1.196 6, 说明居群间存在着一定的基因流。

3.4 聚类分析

利用 Population (1.2.28) 软件, 根据 Nei's 遗传距离对滇重楼各居群进行 UPGMA 聚类分析。以无偏遗传距离 0.27 为阈值, 可以分为 2 大类, 居群 Pop1~4 聚为 1 支, 居群 Pop5 相对遗传距离较远, 单独聚为 1 支。其中 Pop3 和 Pop4 的遗传距离最近。结果见图 1。

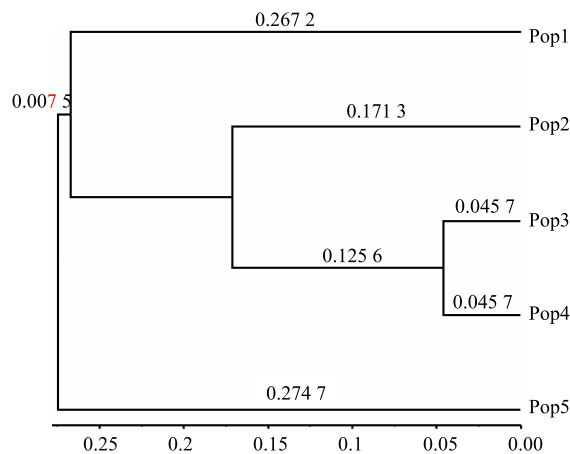


图 1 滇重楼的 UPGMA 树

Fig. 1 UPGMA tree of *P. polyphylla* var. *Yunnanensis* based on Nei's genetic distance

4 讨论

重楼属植物不同种有的外部形态特征较相似, 形态有重叠或交叉而药用品质不一, 某些种不容易鉴别区分, 种内形态变异又较大, 表现出多样性, 而多样性是其物种遗传多样性的物质基础^[14]。目前, 越来越多的分子标记手段运用到重楼属植物遗传多样性的研究上, 张金渝等^[6]采用 RAPD 技术检测了多叶重楼 *Paris polyphylla* Smith 2 个变种滇重楼和七叶一枝花共 4 个居群的遗传多样性, 在种的水平上 PPB 为 92.05%, 滇重楼的 F_{st} 为 0.308 5, 七叶一枝花的 F_{st} 为 0.372 6, 通过和 1 个凌云重楼 *Paris cronquistii* (Takht.) H. Li 居群遗传距离的比较, 支持了滇重楼和七叶一枝花为 1 个种内 2 个变种的亲

缘关系。何俊等^[7]采用 ISSR 分子标记对多叶重楼下 3 个变种滇重楼、狭叶重楼 *P. polyphylla* var. *stenophylla* Franch. 和长药隔重楼 *P. polyphylla* var. *pseudothibetica* H. Li 的 8 个居群共 208 份样品的遗传多样性进行了分析, PPB 为 93.63%, F_{st} 为 0.362 5。唐铭霞等^[8]采用 AFLP 技术对四川省内几个地区的黑籽重楼下 2 变种无瓣黑籽重楼 *Paris thibetica* var. *apetala* Hand. -Mazz. 和原变种 *Paris thibetica* var. *thibetica* (Franch.) Hara 的遗传多样性进行分析, PPB 达 93.63%, F_{st} 为 0.228 6, 上述研究表明重楼属植物具有较高水平的遗传多样性。

本研究采用 8 对 SSR 引物对滇重楼 5 个居群共 115 份样品进行遗传多样性分析, 得到 PPB 为 100%, PIC 为 0.745 6, I 为 2.038 6, 说明滇重楼遗传多样性较高, 具有丰富的遗传变异, 与重楼属其他物种的遗传多样性相似。同时证明选用的 SSR 引物能提供较好的信息, 可以反映 5 个滇重楼居群的遗传多样性。观测 N_a 和 N_e 的差值远远大于 1, 各居群里的等位基因分布不均匀, 同时观测 H_o 和 H_e 的差值较大, 说明各居群内处于不平衡状态或者居群内存在一定程度的内交。这种分布不均匀的原因可能是地理隔离, 生境片段化和人工选择 (采样) 等。

对居群进行遗传变异和基因流分析来看, F_{st} 为 0.172 8, 说明滇重楼各居群间具有一定的遗传分化, 但遗传分化水平不高, 遗传变异主要在各居群内, N_m 为 1.196 6, 居群间存在着一定的基因流。植物居群间的遗传分化是其长期进化发展历史过程的综合反映, 第一, 滇重楼居群间低水平的遗传分化很可能与 (历史上) 频繁的基因交流有关。第二, 李恒^[15]研究表明滇重楼是虫媒花, 为远交物种, 具有较高的遗传多样性和较低的居群遗传分化。第三, 由于过度采挖和生境破坏, 滇重楼居群个体常呈散分布, 本研究为了采集足够的居群样本, 不得不扩大取样的地理范围, 在收集到较多的居群内遗传变异的同时也会降低居群间的遗传分化。第四, 近年来对滇重楼大规模掠夺式的采挖, 居群和生境短时间内严重片段化造成滇重楼各居群间遗传多样性丧失, 处于较低水平。居群的选择和取样以及近年来对滇重楼更加严重的资源掠夺可能是本研究的 F_{st} 低于前人研究的原因。

从 UPGMA 聚类分析的结果来看, 4 个居群 Pop1~4 聚为 1 支, 居群 Pop5 相对遗传距离较远,

单独聚为 1 支。Pop5 居群来自腾冲, 其遗传距离相对其他最远的原因可能为 (1) 海拔最低, 导致与其他 4 个海拔较高居群相比, 年平均气温较高, 降雨量相对充足, 气候湿润; 不同环境和地区会导致种群在遗传多样性以及群体遗传结构上都存在着很大的不同^[16]; (2) 高黎贡山的地理阻隔, 与其他居群基因交流相对困难; (3) 低海拔地区的人类活动更加密集, 对低海拔群体的采集和开发造成了遗传多样性的损失。由表 3 也可以得出 Pop5 居群在 5 个居群中遗传多样性水平最低。

从本研究的实验结果来看, 滇重楼具有较高的遗传多样性, 居群间具有一定的遗传分化, 人为因素是导致滇重楼目前资源匮乏和居群破坏、分布零星的直接原因之一。为了保护 and 科学利用滇重楼的珍贵资源, 建议从以下几方面入手: 第一, 保护滇重楼栖息地, 制止过度采挖; 第二, 滇重楼的遗传多样性主要在居群内, 可以对生境较好规模较大的居群进行就地保护, 对生境破坏严重分布零星的滇重楼进行迁地保护; 第三, 加快种质研究和保护, 进行引种驯化; 第四, 扶持开展滇重楼人工规范化种植。只有全面实行各项措施, 才能拯救滇重楼这一濒危珍贵资源, 缓解社会需求同生态环境的尖锐矛盾。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张树藩. 重楼属植物的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 海峡药学, 2007, 19(6): 4-7.
- [3] 曾莉娟, 郑成木. SSR 技术及其应用 [J]. 热带农业科学, 2001, 3(91): 56-59.
- [4] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [6] 张金渝, 虞 泓, 张时刚, 等. 多叶重楼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, 2004, 12(5): 517-522.
- [7] 何 俊, 杨柏云, 陈少风, 等. 多叶重楼遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(4): 388-392.
- [8] 唐铭霞, 王 丽, 翁 周. 黑籽重楼种内 AFLP 遗传多样性及遗传分化研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(2): 402-408.
- [9] 辛本华, 田孟良, 吴镔镔, 等. 重楼属植物遗传多样性的 RSAP 标记 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3425-3427.
- [10] Zheng J Y, Wang H, Chen X X, *et al.* Microsatellite markers for assessing genetic diversity of the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Trilliaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 1975-1980.
- [11] Song Y, Li M F, Xu J, *et al.* Polymorphic microsatellite markers in the traditional Chinese medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 9939-9942.
- [12] Wang L, Yang Y, Zhao Y, *et al.* De Novo characterization of the root transcriptome and development of EST-SSR markers in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*, an endangered medical plant [J]. *J Agr Sci Tech*, 2016, 18(2): 437-452.
- [13] 杨维泽, 许宗亮, 杨绍兵, 等. 三种植物 EST-SSR 引物在滇重楼上的通用性分析 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(4): 1686-1690.
- [14] Schaal B A, Hayworth D A, Olsen K M, *et al.* Phylogeographic studies in plants: Problems and prospects [J]. *Mole Ecol*, 1998, 7(4): 465-474.
- [15] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [16] 赵 罕, 郑勇奇, 李 斌, 等. 白皮松天然群体遗传结构的地理变异分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 359-401.