

广西地不容种质资源的 ISSR 分析

覃 艳, 黄宁珍*, 赵志国, 李 锋

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘 要: 采用简单序列重复区间扩增 (ISSR) 分子标记技术对广西地不容 3 个野生居群和 1 个引种居群共 92 个个体进行了遗传多样性研究。10 个引物共扩增出 61 条带, 其中 60 条具多态性, 多态性位点百分率为 98.36%。4 个居群多态性百分率在 73.77%~86.89%。Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.337 9, Shannon 信息多样性指数 (I) 为 0.505 5。3 个野生居群 Nei's 遗传分化系数 (G_{st}) 表明: 83.87% 遗传变异分布在居群内, 16.13% 的遗传变异分布在居群间。引种居群与 3 个野生居群间的遗传一致度达 0.884 6。引种居群有效地保护了广西地不容的遗传多样性。

关键词: 广西地不容; 遗传多样性; ISSR; 种质资源

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)03-0406-04

ISSR analysis on the germplasm resources of *Stephania kwangsiensis*

QIN Yan, HUANG Ning-Zhen*, ZHAO Zhi-Guo, LI Feng

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the
Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The genetic variations among the introduced population and three wild populations of *Stephania kwangsiensis* were analyzed by ISSR marker. Ten primers gave rises to 61 discernible DNA bands, of which 61 (98.36%) were polymorphic, indicating a considerable genetic variation at specific level. At the population level, the percentage of polymorphic bands (PPL) was from 73.77% to 86.89%. Genetic diversity analysis showed that Nei's gene diversity (H) was 0.337% and Shannon's genetic diversity index (I) was 0.505 5. Based on Nei's G_{st} value of three wild populations, a large proportion of genetic variance (83.87%) was among individuals within population, while only a small proportion (16.13%) genetic variance was among populations. Genetic identity between the introduced population and three wild was 0.884 6. The introduced population effectively protected the genetic diversity of *S. kwangsiensis*.

Key words: *Stephania kwangsiensis*; genetic diversity; ISSR; germplasm resource

广西地不容 (*Stephania kwangsiensis*) 属防己科千金藤属多年生草质落叶藤本植物, 产于广西西北部至西南部、云南东南部, 生于石灰岩地区的石山上 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1996)。在广西主要分布于百色地区靖西、凌云、那坡等县, 是广西壮族等少数民族民间常用草药, 其块根是生产中药镇痛定的重要原料, 在临床上用于镇痛、镇静、

解热等 (王宪楷等, 1990)。近年来广西地不容受到人为的乱采滥伐等因素的影响, 生存受到威胁, 个体数量变得稀少。而物种的遗传多样性是物种长期进化的产物, 也是其生存和发展的前提。对稀有濒危植物遗传多样性和遗传结构的研究, 是探讨其适应性、生存力的基础, 也是分析致濒机理的基础, 从而帮助制定科学有效的保护策略和措施 (李海生等,

收稿日期: 2005-10-19 修回日期: 2006-03-11

基金项目: 广西科技攻关项目 (0322024-3B) [Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0322024-3B)]

作者简介: 覃艳 (1976-), 女, 广西柳州人, 硕士生, 研究方向为保护生物学

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: huangnz@gxib.cn)

2004)。由于广西地不容资源及地理分布的局限性,以往的研究集中在分类、有效成分的分离与鉴定以及药理活性的初步研究(闵知大等,1980;成桂仁等,1981),缺乏在分子水平上遗传多样性方面的研究报道。ISSR(inter-simple sequence repeat)是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。该技术具有 DNA 样品用量少、操作简单无需预先知道受试基因组 DNA 序列、结果记录方便、实验成本低、能提供丰富的关于基因组的信息等优点,是比较理想的分子标记技术。ISSR 分子标记已用于小麦、水稻等大田作物和苹果、柑橘等果树的遗传分析研究,在中草药中的应用报道较少。本研究采用 ISSR 分子标记来研究广西地不容遗传多样性水平和遗传结构,为寻找、保护和利用优良的种质资源提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

根据广西地不容的地理分布情况,选取分布较集中的广西靖西、凌云、那坡等三个地区为采样点,引种居群是从广西靖西、凌云、那坡等县引种,栽培于桂林植物园中。随机选取居群内的个体作为样本,凌云居群和引种居群分别取样 24 个个体,靖西居群和那坡居群分别取样 22 个个体,每株采取 5~6 片嫩叶,用硅胶干燥保存。各居群的产地及生境特点等见表 1。

1.2 DNA 提取

用 CTAB 法(Doyle 等,1987)提取植株的总 DNA,以北京鼎国生物技术有限责任公司生产的 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒纯化总 DNA,用 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。

1.3 ISSR 反应条件及程序

ISSR-PCR 扩增反应条件确定为:25 μ L 的 PCR 反应液内含:模板约 60 ng,1U Taq 酶,2.0 mmol/L $MgCl_2$,10 mmol/L Tris-HCl pH8.3,5.0 mmol/L KCl,4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L,引物 0.3 μ mol/L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,然后进行 40 个循环,94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,52 $^{\circ}C$ 复性 45 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min,循环结束后 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像仪上观察照像、记录。

1.4 引物筛选

ISSR 引物序列是根据加拿大 British Columbia 大学公布的序列设计,由上海 Sangon 公司合成,从 69 个引物中选出 10 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应(表 2)。

表 1 广西地不容样品的产地和生境
Table 1 The localities and habitats of the samples of *Stephania kwangsiensis*

居群 Population	产地 Locality	采样数 Sampling size	生境 Habitat
靖西(JX)	距广西靖西县城 2 km ²	22	石灰岩山地、缝穴、灌丛
凌云(LY)	距广西凌云县城 1 km ²	24	石灰岩山地、缝穴、灌丛
那坡(NP)	广西那坡县平孟镇	22	石灰岩山地、缝穴、灌丛
引种(YZ)	桂林植物园引种栽培 5 年	24	桂林植物园,红壤

表 2 ISSR 引物序号与引物扩增情况
Table 2 List of ISSR primers and their sequences and amplification

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	统计位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci
808	(AG)8C	7	7
811	(GA)8C	7	7
815	(CT)8G	5	5
817	(CA)8A	7	7
818	(CA)8G	7	7
825	(AC)8G	6	5
827	(AC)8G	7	7
855	(AC)8YT	6	6
857	(AC)8YG	6	6
866	(CTC)5	4	4

Note: Y=C or G.

1.5 扩增产物和差异带的分析方法

根据各分子标记的迁移率及其有无统计所有的二元数据,有带记作 1,无带记为 0,强带和弱带的赋值均为 1。对于多态位点,选取在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析。

用 POPGENE32 软件统计下列参数(1)多态性位点百分率(PPL);(2)Nei's 基因多样性指数(H)(Nei,1973);(3)Shannon 信息多样性指数(I);(4)总居群基因多样性度(H_t)和各居群基因多样性度(H_s);(5)基因流(Nm)和基因分化系数(Gst);(6)Nei's 遗传距离(D)(Nei,1972)和遗传一致度。

用 NTSYS-PC2.1 软件计算单株间的 Nei's 遗传距离(Ne),并用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 广西地不容的 ISSR 遗传多样性

筛选的 10 个引物对 92 个样品进行 PCR 扩增(图 1)共检测到 61 个位点,其中多态性位点 60 个,占总位点数的 98.36%,每个引物扩增的位点数 4~7 个。扩增的条带在 300~2 500 pb 之间。4 个居群的 Nei's 基因多样性指数为 0.337 9,4 个居群的

Shannon 信息多样性指数为 0.505 5。

2.2 广西地不容三个野生居群遗传变异的分析

POPGENE 分析结果(表 3),广西地不容 3 个野生居群总 PPL 为 98.36%,居群内的 PPL 在 73.77%~86.89%之间;Ne's 基因多样性指数为 0.305 0;Shannon 信息多样性指数为 0.489 9(表 3)。基因多样性为 0.271 4;基因分化系数为 0.161 3,表明居群间遗传变异占总遗传变异的 16.13%,居群内的遗传变异占遗传变异的 83.87%,遗传变

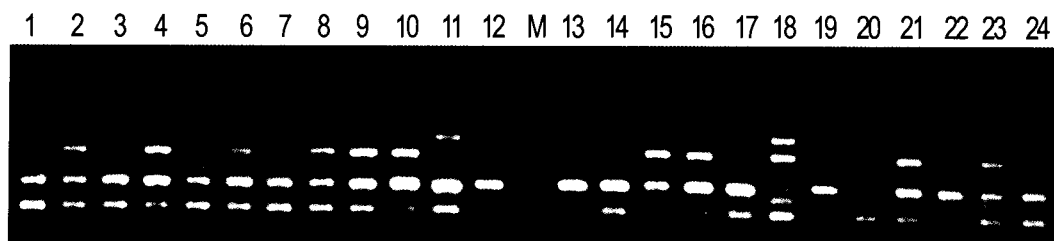


图 1 引物 825 对凌云居群(LY)样品扩增产生的谱带

Fig. 1 ISSR bands of Lingyun(LY)population samples amplified with primer 825

表 3 广西地不容居群遗传变异统计

Table 3 The genetic variation statistics among populations of *Stephania kwangsiensis*

居群 Population	总位点数 Total No. of loci	多态位 点数 No. of PPL	PPL (%)	H	I
靖西(JX)	61	53	86.89	0.2761	0.4188
凌云(LY)	61	51	83.61	0.2948	0.4427
那坡(NP)	61	45	73.77	0.2432	0.3675
引种(YZ)	61	52	85.25	0.2916	0.4349
三个野生居群	61	60	98.36	0.3250	0.4899
四个居群	61	60	98.36	0.3379	0.5055

表 4 广西地不容居群间 Nei's(1972)遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 4 Nei's(1972)genetic identity(top right corner) and genetic distance(bottom left corner)of *Stephania kwangsiensis*

Pop ID	引种(YZ)	凌云(LY)	那坡(NP)	靖西(JX)
引种(YZ)	* * * *	0.9089	0.8730	0.8719
凌云(LY)	0.0955	* * * *	0.8581	0.8696
那坡(NP)	0.1358	0.1530	* * * *	0.9495
靖西(JX)	0.1371	0.1397	0.0518	* * * *

异主要分布在居群内的个体间;基因流为 2.599 2。居群间的遗传距离矩阵和遗传一致度(表 4),引种居群与 3 个野生居群的平均遗传一致度达 0.884 6。

2.3 聚类分析

根据个体间的遗传距离(Nei,1979)对靖西、凌云、那坡三个野生居群共 68 个个体进行 UPGMA

聚类分析,基于相似性系数(Nei 和 Li 的系数)得到的聚类树状图见图 2。除了凌云居群聚在一起,那坡和靖西 2 个居群没有按各自居群聚在一起,这进一步表明居群间的遗传分化较小。

3 讨论

利用简单重复序列 ISSR 标记对不同物种基因组 DNA 进行扩增,其多态性表现不同,如果蔗种质资源 PPL 为 61.35%(王水崎等,2003),大蒜种质资源的 PPL 为 50.21%(陈昕等,2005),鱼腥草种质资源 PLL 为 92.3%(吴为等,2003),本研究结果表明广西地不容种质资源 PLL 为 98.3%,靖西、凌云、那坡三个野生居群的 PPL 分别为 86.89%、83.61%、73.77%,引种居群的 PPL 为 85.25%,表现了较高的遗传多样性水平。3 个野生居群的 G_{st} 为 0.161 3,表明居群间的遗传变异占总遗传变异的 16.13%,83.87%的遗传变异分布在居群内的个体间。居群内的遗传多样性水平较高,但居群间的遗传分化不明显。

广西地不容为多年生草质藤本植物,单性、雌雄异株,异交,这样的生物特征使广西地不容有较高的遗传多样性水平,3 个野生居群间的基因流高达 2.599 2,由于地不容长期生长在特殊的地理环境,为石灰岩地区特有植物,主要靠风力、昆虫、鸟等动

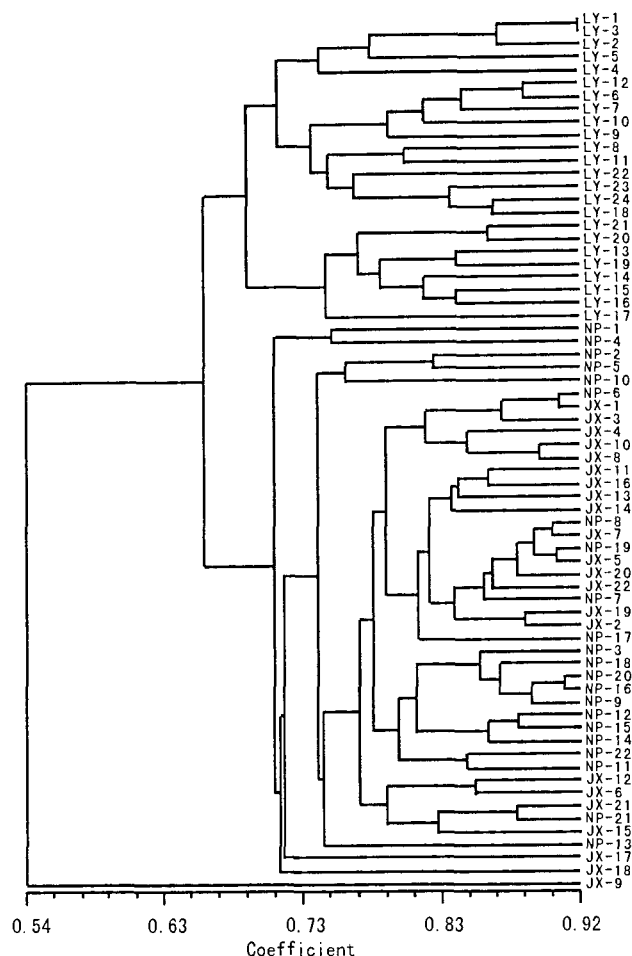


图2 广西地不容个体 UPGMA 聚类图(居群代号同表 1)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the 68 samples of *Stephania kwangsiensis*

物载体传播花粉及种子,造成较大的基因流动。3 个野生居群的 *Gst* 仅为 0.161 3,显示出高水平的居群内变异而低程度的居群间分化。影响居群遗传结构的因素很多,如繁育系统、分布范围、种子传播机制等(Hamrick,1987)。靖西和那坡两个居群间的距离较近,且立地及气候条件较相似,两居群的植物个体间有很近的亲缘关系。用 UPGMA 法对野生居群 68 个个体之间进行聚类分析,结果表明除了凌云居群外,其他 2 个居群中的个体并非单独聚为一类,也表明了这一点。远交降低了结合配子间的一致性,提高重组率,加上远交能促进花粉运动和远距离基因流,从而避免居群出现分化(Brown 等,1989),因而检测到的遗传变异主要分布在居群内。

在取样时,很难发现地不容的幼苗存在,原因可能是广西地不容种子的种壳很硬,大多数情况下胚很难冲破种壳萌发,种子贮存时间过久或过度干燥,

都会影响其活力,因此繁殖能力较差,再加上种子较小,果实落地后易受虫子啃食或是被风吹后,生长地可能缺乏种子萌发、幼苗生长的立地条件,所以其只能以小群落、低数量状态存在。

根据我们的调查广西地不容已属稀有濒危植物。保护广西地不容除应在其天然生长地实行就地保护,保护其生境,制止乱采滥伐外,还应进一步实施迁地保护工作。保护物种,从某种意义上说,就是保护物种的遗传多样性或进化潜力。种内遗传多样性或变异性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈大,其进化的潜力也就愈大(施立明,1990)。从研究结果来看,引种居群与三个野生居群遗传多样性差异不大,平均遗传一致度高达 0.884 6。表明迁地保护的广西地不容很大程度上保持了原生居群的遗传多样性,引种保护较为成功。为了全面保护该物种的遗传多样性,还应加强对其采种育苗和引种等方面的工作,尽快让居群数量得以恢复,这方面的工作近年来广西植物研究所已取得了一定的进展。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1996. 中国植物志(第 30 卷第 1 分册)[M]. 北京:科学出版社:40—70
- Brown AHD, Burdon JJ, Jarosz AM. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems[M]//Soltis DE, Soltis PS(eds). Isozymes in plant biology. Portland, OR: Dioscorides Press:73—86
- Chen X(陈昕), Zhou HT(周涵韬), Yang ZW(杨志伟), et al. 2005. Assessment of genetic diversity of Garlic(*Allium sativum*) by the technique of molecular marker(大蒜种质资源遗传多样性的分子标记的研究)[J]. *J Xiamen Univ(Nat Sci)*(厦门大学学报自然科学版), 31(4):144—149
- Cheng GR(成桂仁), Wang GQ(王桂青), Wen YX(文永新). 1981. Studies on the alkaloids from *Stephania kwangsiensis*(广西地不容生物碱的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug*(中国传统草本药物), 12(4):6—8
- Deng YC(邓业成), Xu HH(徐汉虹). 2005. Studies on insecticidal activities and active ingredients of *Stephania kwangsiensis*(广西地不容的杀虫活性及有效成分研究)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 38(3):523—527
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *phytochem Bull*, 19:11—15
- Hamrick JL. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[M]//Differentiation Patterns in Higher plants. New York: Academic Press:53—67
- He HQ(何华勤), Jia XL(贾小丽), Liang YY(梁义元), et al. 2004. Assessment of genetic diversity of allelopathic rice germplasm based on RAPD and ISSR(RAPD 和 ISSR 标记对水稻化感种质资源遗传多态性的分析)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 31(9):888—894

(下转第 413 页 Continue on page 413)

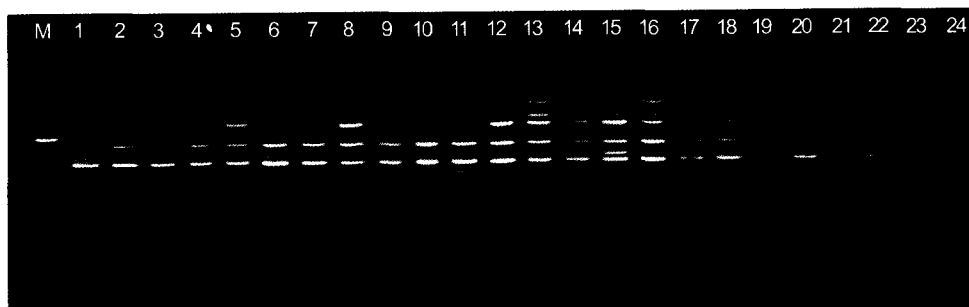


图 6 优化后反应体系的 RAPD 结果

Fig. 6 The result of optimized reaction system on RAPD analysis

RAPD 进行优化,而本实验经过多次重复,都能很好地反映以上结果。利用 UBC 公司(加拿大)引物优化的体系在对于华美公司合成的引物(如 OPD19)扩增时得到很好的 RAPD 图谱(图 6),这说明不同公司的引物可用于本文优化的 RAPD 体系。

因此本实验得出桔梗 RAPD 扩增反应的最佳体系为:在 20 μ L PCR 反应体积中,模板 DNA 20 ng, dNTP 150 μ mol/L,引物 0.3 μ mol/L, Mg^{2+} 为 1.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 Unit, 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L。按照优化的 RAPD 条件进行实验,重现性良好。

参考文献:

刘德军,冯维希. 2001. 桔梗[M]. 中国中医药出版社
舒雯,高山林. 2001. 桔梗研究进展[J]. 中国野生植物资源, 20 (2):4-6,23

Chang AX(常爱霞), Qu YS(瞿永生), Jia XH(贾兴华). 2004. Optimization of tobacco RAPD reaction system and studies on polymorphic marker of tobacco varieties(烟草 RAPD 反应体系优化及品种多态性标记研究)[J]. China Tobacco Sci(中国烟草科学), (2):9-13

Tao J(陶钧), Luo ZY(罗志勇), Liu SP(刘水平), et al. 2005. Optimizing of RAPD amplifying condition and analysis of genetic DNA polymorphisms of *Gastrodia elata* Blume(RAPD 条件优化及天麻基因组 DNA 多态性分析)[J]. Life Sci Res(生命科学研究), 9(2):150-155

Zhao XH(赵喜华), Wang MY(王曼莹). 2005. Optimization of RAPD conditions of *Rhododendron*(杜鹃花 RAPD 条件的优化)[J]. Biotechnology(生物技术), 15(1):41-43

Zhang JY(张吉宇), Yuan QH(袁庆华), Zhang WS(张文淑), et al. 2004. Genomic DNA extraction and optimizing RAPD procedure of *Lespedeza floribunda*(多花胡枝子基因组 DNA 提取与 RAPD 反应体系优化)[J]. Acta Agrestis Sin(草地学报), 12(3):219-222,230

(上接第 409 页 Continue from page 409)

Li HS(李海生), Chen GZ(陈桂珠). 2004. Genetic diversity of *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) in China detected by intersimple sequence repeats (ISSR) analysis(中国卵叶海桑遗传多样性的 ISSR 研究)[J]. Guihaia(广西植物), 24(1):17-22

Min ZD(闵知大), Zhong SM(钟守明). 1980. Studies on the alkaloids from *Stephania kwangsiensis*(广西地不容生物碱的研究)[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 15(9):532-537

Peng YT(彭云涛), Tang SQ(唐绍清). 2005. Genetic diversity of *Siraitia grosvenorii* detected by ISSR markers(野生罗汉果遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. Biodiversity Sci(生物多样性), 13(1):36-42

Qian W(钱韦), Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granolata* detected by RAPDs and ISSR(采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性)[J]. Acta Bot Sin(植物学报), 42 (7):741-750

Qiu YH(邱英雄), Fu CX(傅承新), He YF(何云芳). 2002. Identification of *Michelia tosoi* types using ISSR-PCR marker

assays(乐昌含笑不同类型鉴定的 ISSR-PCR 分析)[J]. Sci Silv Sin(林业科学), 38(6):49-52

Shi LM(施立明). 1990. Genetic diversity and conservation(遗传多样性及其保护)[J]. Biosci Inform(生物科学信息), (2):158-164

Wang SQ(王水琦), Lin YQ(林彦铨), Yang H(杨浩), et al. 2003. RAPD and ISSR analysis of germplasmic resources of chewing cane(果蔗种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析)[J]. Acta Agric Univ Jiangxi(Nat Sci)(江西农业大学学报自然科学版), 3:412-417

Wu W(吴卫), Zheng YL(郑有良), Chen L(陈黎). 2003. Analysis on genetic diversity of germplasm resources of *Corallorhiza innata* by ISSR marker(利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性)[J]. World Sci Tech Modern Trad Chin Medicine Mat Med(世界科学技术—中医药现代化), 1:70-77

Zietkiewicz, Rafalskia, Labudat. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 20:176-183