

基于 RAPD 标记的罗布麻野生居群遗传多样性分析

彭雪梅¹, 张卫明^{1,2}, 王洋阳¹, 顾龚平², 陆长梅¹

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

[摘要] 利用 RAPD 技术对采自我国 8 个省份的 9 个罗布麻野生居群进行遗传多样性分析。从 80 条随机引物中筛选出 17 条引物, 共扩增出 157 条带, 其中多态性带 108 条。物种水平的多态位点百分率 (PPB) 为 68.79%, Nei's 基因多样性指数 H 为 0.2296, Shannon's 多态性信息指数 I 为 0.3390。居群间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.8841, 即 11.59% 的遗传变异来自于居群内, 88.41% 的遗传变异来自于居群间, 居群间的遗传分化水平远高于居群内。居群间遗传距离与聚类结果显示各居群间的亲缘关系与地理分布不完全相关。针对现有罗布麻的遗传多样性现状, 建议加强对现有自然居群的保护。

[关键词] 罗布麻, 野生居群, 遗传多样性, RAPD

[中图分类号] Q16 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)04-0092-05

Genetic Diversity Study on Wild Populations of *Apocynum venetum* Using RAPD Marker

Peng Xuemei¹, Zhang Weiming^{1,2}, Wang Yangyang¹, Gu Gongping², Lu Changmei¹

(1 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2 Nanjing Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

Abstract Genetic diversity of *Apocynum venetum* was studied by the method of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in this paper. Out of 9 wild populations from 8 provinces of China, 157 bands were produced with 17 random primers and 108 of them were polymorphic. At species level, its polymorphic loci percentage, Nei's genetic diversity index and Shannon's information index were 68.79%, 0.2296 and 0.3390 respectively. The total gene differentiation (G_{st}) of *A. venetum* was 0.8841. This indicated that 88.41% of genetic variation resided among populations and genetic variation among populations was much higher than that within populations. Results from genetic distances and cluster analysis showed that relationships among populations was not completely correlated with their geographical distances. According to the current genetic diversity situation of *A. venetum*, protection of natural population was suggested to be strengthened.

Key words *Apocynum venetum*, wild population, genetic diversity, RAPD

罗布麻 (*Apocynum venetum* Linn) 是夹竹桃科 (*Apocynaceae*) 罗布麻属 (*Apocynum* L.) 的一种多年生宿根草本植物, 在我国华东、东北、华北以及西北等 10 多个省区都有分布 (表 1)^[1], 其叶片内含类黄酮、氨基酸等药用成分^[2], 可预防和缓解高血压、高血脂、冠心病等症, 入药历史已逾千年^[3]。近几年, 随着人们保健意识的增强, 罗布麻的药用和保健价值重新被人们认识, 罗布麻产品大量进入药品和保健品市场, 过度的开发导致罗布麻资源遭受极大破坏。2005 年在由南京野生植物综合利用研究院组织的全国罗布麻资源考察时发现, 罗布麻纯群落少见, 且群落面积很小。现有罗布麻资源已不能满足罗布麻生产的需求, 各地厂家由于资源缺乏而纷纷转产停产。此外, 资源量减小也会导致物种遗传多样性降低, 而物种遗传多样性降低到一定程度就有可能导致物种濒危。为预防罗布麻濒危, 并能可持续利用罗布麻, 很有必要知晓我国的

收稿日期: 2008-03-12

基金项目: “十五”国家科技攻关基金 (2004BA502B10)、江苏省高新技术研究计划 (BG2006318) 资助项目。

通讯联系人: 陆长梅, 博士, 副教授, 研究方向: 植物学。E-mail: lchangmei@njnu.edu.cn

罗布麻资源状况及其遗传多样性. 而国内外尚未见这方面的研究报道.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分子标记已被证明是一种简单而又有效的研究植物群体遗传多样性和遗传结构的方法^[4-6]. 本研究借助于 RAPD 技术对分布于我国 8 省的 9 个罗布麻野生居群进行研究, 旨在揭示罗布麻野生资源的遗传多样性状况, 探讨野生居群间的亲缘关系, 并据此初步提出罗布麻的保护措施, 为罗布麻资源保护和优良资源的选育提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用材料均由南京野生植物综合利用研究院组织的 2005 年全国罗布麻资源科学考察队采集. 由于罗布麻在自然条件下主要进行无性繁殖, 为避免对同一植株遗传组成完全相同的不同基株的重复采集, 不同样本间的距离至少在 1 km 以上. 叶片经硅胶干燥或自然干燥保存, 并由钱学射研究员与肖正春研究员鉴定.

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取与检测

称取 30 mg 干燥叶片加液氮充分研磨成粉末状, 采用改进的 Qiagen 法提取总 DNA^[7]. 所提模板 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳及 EB (溴化乙锭) 染色后, 观察其质量和纯度.

1.2.2 引物筛选与 PCR 扩增

本实验所用引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 共计 80 条, 分别标记为 A01~A20 B01~B20, C01~C20 D01~D20. 所用 PCR 反应缓冲液、Taq 酶及 dNTP 等购自上海申能博彩生物有限公司. 反应在 PTC-200 扩增仪 (美国 BIO-RAD 公司) 上进行. 从 9 个居群中各选一个样本的 DNA 作为模板, 进行 RAPD 体系优化和引物筛选. 最终确定 PCR 反应体系如下: 总体积为 25 μ L, 其中 MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 5 μ mol, 模板 DNA 30 ng, Taq 酶 1.5 U, 随机引物 10 μ mol.

反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 36 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 42 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 反应结束后 4 $^{\circ}$ C 保存. PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统 (UVP GDS-8000) 进行图谱采集.

1.2.3 数据统计分析

罗布麻 9 个居群经不同引物扩增所得条带, 按琼脂糖凝胶电泳图谱同一位置上 DNA 条带的有无, 将电泳结果转化为二元数据矩阵, 有带的 (包括弱带) 赋值为 1, 无带的为 0. 运用 Popgen32 软件分析罗布麻 9 个居群的 Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 信息指数 (I)、居群间基因分化系数 G_{st} 及基因流 Nm 和遗传距离等; 运用 NTSYS-PC (version 2.10e) 分析居群间遗传相似度, 并据此运用 UPGMA 方法对各居群进行聚类分析, 并根据 9 个居群特征性条带的存在和缺失, 作为分子鉴别的依据.

2 结果与分析

2.1 罗布麻的遗传多样性及遗传分化

从 80 条 10 bp 随机引物中筛选出 17 条重复性好且多态性丰富的引物, 对罗布麻 9 个野生居群进行了 RAPD 扩增, 并对扩增结果进行统计 (详见表 2), 共获得 157 条扩增条带, 各引物的扩增带数为 4~13 不等, 平均为 9.24 条, 扩增 DNA 片段长度介于 200~2000 bp. 其中 49 条带 (约占 31.21%) 在罗布麻 9 个居群中都存在, 其余 108 条带为多态性带, 多态 PPB 为 68.79%.

运用 Popgen32 软件分析罗布麻 9 个野生居群的 PPB, Nei's 基因多样性指数 (H) 以及 Shannon's 信息指数 (I) 显示 (见表 3): 各居群的 PPB 在 10.00%~15.78% 之间; Nei's 指数和 Shannon's 指数均小于 0.1, 表明罗布麻野生居群内遗传多样性水平很低, 且不同的居群其遗传多样性水平不同, 表现为位于西北

表 1 9 个罗布麻居群来源与样本采集数

Table 1 Localities and sample sizes of 9 populations of *A. venetum* used in this study

编号	居群代号	来源	样本数
1	XJA	新疆阿勒泰	5
2	XJK	新疆库尔勒	5
3	NM	内蒙通辽扎旗	5
4	GS	甘肃玉门	5
5	NX	宁夏银川	5
6	SX	陕西兴平	5
7	HN	河南三门峡	5
8	JS	江苏东台	5
9	JL	吉林长岭	5

干旱地区如新疆、内蒙、宁夏等地的罗布麻居群多样性相对较高(甘肃居群例外),而位于东部地区如河南、江苏、吉林等地的罗布麻居群多样性相对较低。

表 2 17 条有效随机引物序列及其扩增结果

Table 2 Sequences and amplifications of 17 effective random primers

引物号	序列 (5' - 3')	条带数	引物号	序列 (5' - 3')	条带数
A02	TGCCGAGCTG	7	C06	GAACGGACTC	8
A09	GGTAA CGCC	11	C09	CTCA CCGTCC	13
A14	TCTGTGCTGG	8	C10	TGTCTGGGTG	8
A17	GACCGCTTGT	9	C15	GACG GATCAG	9
B01	GTTCGCTCC	9	D16	AGGGCGTAAG	13
B02	TGATCCCTGG	4	D18	GAGAGCCAA C	11
B03	CATCCCCCTG	9	D20	ACCCG GTCAC	8
B05	TGCGCCCTTC	9	B11	GTA GACCCGT	13
B08	GTCCACACGG	8	(总计)		157

表 3 罗布麻不同居群遗传多样性比较

Table 3 Genetic diversity of different populations of *A. venetum*

居群代号	总条带数	多态性条带数	多态百分率	Nei's 多样性指数	Shannon's 信息指数
XJA	114	18	15.78	0.0401	0.0547
XJK	109	17	15.60	0.0394	0.0533
NM	107	14	13.08	0.0242	0.0351
GS	99	11	11.11	0.0216	0.0300
NX	117	15	12.85	0.0237	0.0333
SX	98	10	10.20	0.0202	0.0284
HN	102	12	11.77	0.0225	0.0310
JS	104	12	11.54	0.0220	0.0305
JL	90	9	10.00	0.0200	0.0255

从物种水平分析罗布麻遗传多样性发现, Nei's 基因多样性指数为 0.2296, Shannon's 多态性信息指数为 0.3390。此外,居群间遗传分化系数(Gst)高达 0.8841,表明罗布麻种内的遗传分化有 88.41% 发生在居群间,只有 11.59% 发生在居群内部个体之间。由 Gst 得到居群间的基因流(Nm)只有 0.0727,可见罗布麻野生居群间基因交流很小。

2.2 遗传距离和聚类分析

遗传距离(表 4 对角线下方)结果显示: 9 个居群间的遗传距离在 0.1734~0.5564 之间,平均为 0.3649。XJK 居群与 JS、JL 居群的遗传距离最远,而 XJA 居群和 XJK 居群的遗传距离最近。运用 NTSYS-PC 软件分析居群间遗传相似度(表 4 对角线上方)显示: 虽然遗传相似系数与遗传距离呈相反趋势,但两者所反映的罗布麻居群间的亲缘关系是一致的。

表 4 罗布麻不同居群间的遗传距离和遗传相似度(对角线下方为遗传距离,对角线上方为遗传相似度)

Table 4 Genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) among 9 populations of *A. venetum*

居群编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 XJA	* * * *	0.8408	0.7389	0.7261	0.7389	0.6688	0.7197	0.6178	0.6051
2 XJK	0.1734	* * * *	0.7325	0.6815	0.6815	0.6497	0.6497	0.5732	0.5732
3 NM	0.3027	0.3113	* * * *	0.7452	0.7452	0.7134	0.6879	0.6115	0.6115
4 GS	0.3200	0.3834	0.2941	* * * *	0.7962	0.6879	0.7643	0.6879	0.5987
5 NX	0.3027	0.3834	0.2941	0.2279	* * * *	0.7516	0.8153	0.7898	0.6624
6 SX	0.4023	0.4313	0.3377	0.3741	0.2856	* * * *	0.7580	0.6943	0.6943
7 HN	0.3289	0.4313	0.3741	0.2688	0.2042	0.2771	* * * *	0.7452	0.7070
8 JS	0.4815	0.5564	0.4919	0.3741	0.2360	0.3649	0.2941	* * * *	0.6561
9 JL	0.5024	0.5564	0.4919	0.5130	0.4119	0.3649	0.3467	0.4215	* * * *

根据遗传相似系数构建的系统聚类树状图更直观地反映了居群间的亲缘关系(图 1 所示): 9 个居群总体上聚成 3 个大支,其中 XJA 和 XJK 两居群的相似度最高,并与地理位置较近的 NM 居群构成一支(a 支),显示罗布麻居群间的亲缘关系与居群间的地理分布有一定的相关性;但跨越我国从西到东的 5 个省份的 5 个居群依次在不同的相似系数处聚类构成另一大支(b 支);而同样位于东部的吉林居群却因与其它居群相似系数最小而独立构成一支(c 支);甘肃居群虽位于新疆和内蒙居群的中间,但甘肃居群并未和

新疆、内蒙居群聚成一支. 这显示罗布麻各居群间的亲缘关系与居群所处地理位置有一定的相关性, 但并不完全相关.

罗布麻野生居群间的亲缘关系与各自地理位置的不完全相关, 可能是因为罗布麻各居群间少有基因交流, 且各居群间因自然地理环境的不同导致各居群在各自的自然环境下发生了非定向性变异, 最终导致一些地理距离相距较远的居群在聚类图上却相互靠近.

2.3 居群间分子鉴别的可能性

虽然筛选出的 17 条引物对罗布麻 9 个居群的扩增带多态性都较丰富, 且居群内不同个体间多有少量差异, 但引物 B03 对每个居群内的 5 个个体的扩增图谱相同, 但居群间互不相同 (图 2). 是否引物 B03 日后可发展为罗布麻野生居群鉴别的手段, 还需要进一步扩大居群及样本的个体数进一步进行分析.

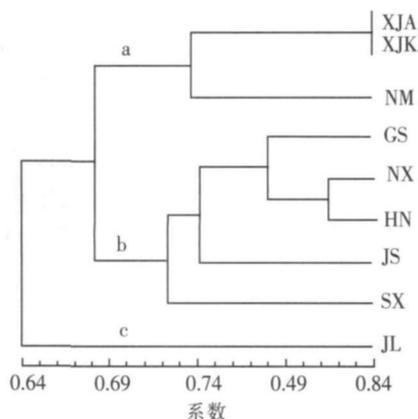
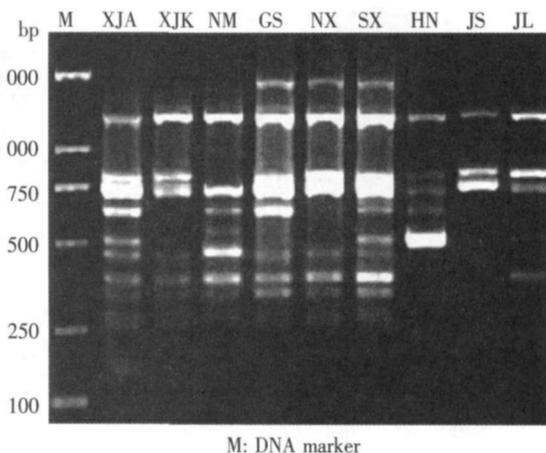


图 1 罗布麻 9 个居群间遗传相似度聚类图

Fig.1 Dendrogram of 9 populations of *A. venetum* using NTSYS-PC cluster analysis



M: DNA marker

图 2 引物 B03 对罗布麻 9 个居群样本的 RAPD 扩增结果

Fig.2 RAPD results of 9 populations with primer B03

3 讨论

物种或居群的遗传结构是基因与基因型在时空上的分布式样, 种内遗传多样性越丰富, 物种对环境变化的适应能力越强, 进化潜力就越大^[8]. 因此, 最大限度地维持种内遗传多样性水平, 是持续利用遗传种质资源的前提和基础^[9].

统计学检验表明, 在居群水平上影响遗传变异大小的因素依次为: 繁育系统 > 分布范围 > 生活型 > 分类地位 > 种子散播机制^[10]. 繁育系统和分布范围是两个影响居群遗传结构和物种遗传变异的最重要因素^[11]. 通常情况下, 风媒传粉、异交为主植物居群间的遗传分化程度较低^[11]. 而罗布麻在野生状态下由于种子难以萌发生长, 常见植株均是经地下根茎营养繁殖而来, 一定范围内罗布麻个体大多来自同一母体, 导致居群内部遗传分化很小 (表 3). 但罗布麻分布范围很广 (从东经 $85^{\circ} \sim 125^{\circ}$), 各居群间长期的生殖隔离和山脉、沙漠等的天然屏障隔离导致居群间基因交流很小 ($N_m = 0.0727$). 在漫长的进化过程中, 各个居群在不同的选择压力下保留和进化了各自的适宜基因, 从而积累了较高水平的遗传变异, 致使居群间存在相对较高的遗传分化. 因此, 在物种水平上, 罗布麻遗传多样性水平并不低, 其多态百分率 (68.79%)、 N_e 's 基因多样性指数 (0.2296) 和 Shannon's 信息指数 (0.3390) 等指标在大多数已被检植物中均处于中等水平^[12-14].

罗布麻具有相对较高的遗传多样性显示遗传多样性大小不是导致罗布麻资源急剧下降的直接原因. 野外调查发现, 罗布麻居群及居群所处的生境都遭到了不同程度的破坏, 罗布麻被砍伐现象比较严重. 可见, 野生居群生境的破坏和过度砍伐是导致罗布麻资源下降的主要原因. 此外, 有研究表明罗布麻各个居群在抗逆、槲皮素与总黄酮含量以及纤维质量等方面都有其遗传特殊性^[15]. 任何一个居群的绝灭不仅会导致罗布麻遗传多样性总体水平降低, 而且还会导致优良性状的消失. 因此, 在对罗布麻野生资源进行保护时应有目的地保存尽量多的罗布麻居群. 这不仅可以保持罗布麻的遗传多样性水平, 同时也为日后罗布麻的品种改良与预防种质退化保留足够的优质基因资源. 在保护时, 可以采用就地和异地两种方式相结合

的保护方式:一方面,为达到对罗布麻居群进行长期有效的保护,在原产地对居群进行保护时,对罗布麻居群的生境同时加以保护;另一方面,收集不同居群罗布麻资源,在整理、鉴定、编目后进行异地(入圃)保护.这两种方式相结合不仅可以保护罗布麻各居群的原有生境与性状,同时还可以对罗布麻各居群进行综合评价与研究,为日后筛选具有优良经济性状、易于人工栽培的特优种质资源提供基础.

[参考文献]

- [1] 张绍武,胡瑞林,钱学射.我国罗布麻分布区的地理区划[J].中国野生植物资源,2000,19(4):20-22
- [2] 薛华茂,钱学射,张卫明,等.罗布麻的化学成分研究进展[J].中国野生植物资源,2005,24(4):6-8,12
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:化学工业出版社,2000
- [4] 左志锐,穆鼎,高俊平,等.百合遗传多样性及亲缘关系的 RAPD 分析[J].园艺学报,2005,32(3):468-472
- [5] 李景欣,乌仁图雅,乌日娜. RAPD 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用[J].畜牧与饲料科学,2004,6:57-58
- [6] Lin W, Mudge K W, Weston L A. Utilization of RAPD markers to assess genetic diversity of wild populations of North American ginseng (*Panax quinquefolium*) [J]. *Planta Medica* 2007, 73(1): 71-76
- [7] 张卫明,王曼丽,彭雪梅,等.三种“罗布麻”干燥叶片基因组 DNA 提取方法[J].南京师大学报:自然科学版,2007,30(1):102-105
- [8] 邹喻苹,葛颂,王晓东,等.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001:140-149
- [9] 李太武,李成华,宋林生,等.5个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析[J].生物多样性,2003,11(2):118-124
- [10] 李巧明,赵建立.云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性研究[J].生物多样性,2007,15(1):84-91
- [11] Brown A H D, Burdon J J, Jaro sz A M. Isozyme analysis of plant mating system [C] // *Isozymes in Plant Biology*, Portland: Dioscorides Press, 1989: 73-86
- [12] 潘庆杰,李正红,王雁,等.地涌金莲野生与栽培种群遗传多样性 RAPD 分析[J].林业科学研究,2007,20(5):668-672
- [13] 王璠琦,黄璐琦,邵爱娟,等.子遗植物杜仲的遗传多样性 RAPD 分析和保护策略研究[J].中国中药杂志,2006,31(19):1583-1586
- [14] 张吉宇,袁庆华,王彦荣,等.胡枝子属植物野生居群遗传多样性 RAPD 分析[J].草地学报,2006,14(3):214-218
- [15] 周丽,王效山,黄和平,等.不同产地罗布麻叶总黄酮的含量测定[J].现代中药研究与实践,2005,19(5):37-38

[责任编辑:孙德泉]