

广西药用植物两面针遗传多样性的 ISSR 分析*

ISSR Analysis on Genetic Diversity of Medically Important *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. in Guangxi

向巧彦,黄夕洋,李虹,蒋水元**

XIANG Qiao-yan, HUANG Xi-yang, LI Hong, JIANG Shui-yuan

(广西壮族自治区、中国科学院广西植物研究所,广西桂林 541006)

(Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:【目的】目前两面针(*Zanthoxylum nitidum*)野生资源逐渐减少,开展对其居群遗传学研究有利于两面针野生资源的保护和可持续利用。【方法】利用 ISSR 分子标记对 11 个广西两面针自然居群共 138 个样本进行 DNA 多态性分析。【结果】从 100 个随机引物中筛选出 8 个有效引物,共扩增出 63 个 DNA 片段,都为多态性条带,多态位点百分率(P)为 100%。两面针在物种水平上具有较高遗传多样性,Nei's 基因多样性(He)和 Shannon 信息指数(I)分别为 0.227 和 0.356。两面针 11 个居群的遗传分化系数(Gst)为 0.490,居群内变异占 51%,居群间变异占 49%,说明居群间和居群内的遗传分化基本持平;居群间基因流(Nm)为 0.52,表明居群间基因流动较贫乏。各居群间的遗传距离在 0.053~0.334 之间,居群间的聚类及 Mantel 检验($r=0.391, p=0.040$)均表明广西两面针居群地理距离与遗传距离之间的相关性不明显。【结论】广西野生两面针种质资源多样性较高,有利于培育高品质的药材品种;就地保护是两面针资源保护的首选,选择个体数量多、居群内变异系数大,自然环境不易受到人为影响的天然居群进行保护。

关键词:药用植物 两面针 遗传多样性 ISSR

中图分类号:S567 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)05-0541-09

Abstract:【Objective】*Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae) is an important medicinal plant mainly distributed in southern China. In recent years, however, the distribution range of this species has been reduced greatly due to human over exploitation and deterioration of its habitat. Studying the population genetics of this species is essential for the conservation and sustainable utilization of the plant germplasm resource.【Methods】In this study, we used eight ISSR markers to measure genetic diversity of 138 individuals from eleven populations of *Z. nitidum* in Guangxi.【Results】A total of 63 DNA fragments were scored, and the percentage of polymorphic bands (P) was 100%. High level of genetic diversity was detected in *Z. nitidum* ($He=0.227$; $I=0.356$). AMOVA analysis indicated that coefficient of genetic differentiation (Gst) was 0.490 (51% of the total genetic variation resided within a population and 49% between populations), which demonstrated that the genetic variation between populations and within a population was roughly equal. Gene flow (Nm) between each population was 0.52, which showed a relatively lacking gene flowing. The genetic distance between each population ranged 0.053~0.334. The results of Mantel test ($r=0.391, p=0.040$) and UPGMA cluster indicated that

there was no significant relationship between geographical distance and genetic distance.【Conclusion】This investigation indicates that the genetic diversity of *Z. nitidum* in Guangxi is high, which is good for the cultivation of high quality herbmedicine; In situ conservation is advocated first, and keeping a stable environment for this herb is necessary.

Key words: medicinal plants, *Zanthoxylum nitidum*, genetic diversity, ISSR

收稿日期:2014-01-18

修回日期:2014-04-19

作者简介:向巧彦(1982-),女,助理研究员,主要从事药用植物栽培育种研究。

* 广西科学研究与技术计划项目(桂科攻 1099063-10),横向项目“两面针病虫害防治技术研究”和“两面针规范化种植技术研究”,广西科学院科技创新项目(2010ZW002)资助。

** 通讯作者:蒋水元(1972-),男,研究员,主要从事中药材引种选育研究。

【研究意义】两面针 [*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.] 系芸香科 (Rutaceae) 花椒属 (*Zanthoxylum*) 多年生木质藤本植物, 因其叶片中脉两面均有小钩刺, 故称两面针, 又名野花椒、入地金牛、蔓椒、双面针、两背针、钉板刺、入山虎、麻药藤、叶下穿针, 分布于广西、广东、云南、福建、湖南和台湾等省区^[1], 多生于低海拔的丘陵地带的灌木丛中^[2], 是广西主产的道地药材, 因质优产量大而扬名国内外。两面针药材是我国临床常用中药, 主要用根, 性味苦、辛、平, 有小毒, 含两面针碱、白屈菜红碱、异崖椒定碱、氯化两面针碱等多种生物碱成分^[3], 能行气止痛、活血化瘀、祛风通络, 主治风湿痹痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、毒蛇咬伤等症, 外用主治汤火烫伤等, 民间广泛应用两面针抗炎镇痛活性^[4]。以两面针为主药或辅药已开发出许多用于治疗骨科痛症、内科感冒、妇科炎症、皮肤炎症、牙痛等疾病药物; 两面针是三九胃泰、正骨水、跌打万花油等著名中成药和日用品两面针中药牙膏的主要原料, 享誉我国的广西柳州“两面针中药牙膏”也是通过在牙膏中添加两面针提取研究物研制而成^[5~7]。以氯化两面针碱为代表的苯吡菲啶类生物碱是近年抗肿瘤研究的热点, 对白血病、路易 (Lewis) 肺癌、肝癌和鼻咽癌等均有较好疗效^[8], 对抑制拓扑异构酶活性有重要作用^[9], 具有比较广泛的开发利用价值。随着社会经济的发展, 两面针被越来越广泛地应用于各个领域, 需求量也越来越大, 人工种植两面针的数量较少, 当前原料供给主要依靠农民的野外采挖。由于两面针主要生长在农林用地的交接地段, 随着农林产业结构的不断调整, 近年来毁

林开荒种植经济果林活动日益频繁, 两面针生境受到严重破坏, 加上过度采挖, 资源急剧下降, 曾经收购过两面针药材的地方现在均出现资源短缺甚至达到无货可收的地步^[7]。遗传多样性是物种适应环境变化和生存繁衍的重要保障。了解居群内和居群间遗传多样性, 对于保育管理尤其重要^[10,11]。**【前人研究进展】**目前, 对两面针的研究主要集中在药材真伪鉴定^[12], 化学成分与药理药性方面^[13], 对其遗传多样性及其居群遗传结构的研究还较少^[14]。ISSR (Inter-simple sequence repeat) 分子标记是调查居群内和居群间遗传多样性的有力工具, 具有重复性高和不需预先获得序列信息的优点, 被广泛用于研究居群遗传多样性^[14~17]。张蕾等人^[14]建立和优化了两面针 ISSR-PCR 反应体系, 为两面针 ISSR 遗传多样性分析打下基础。**【本研究切入点】**本研究在前人基础上运用 ISSR 分子标记技术, 以毛两面针为外类群, 研究广西产 11 个两面针居群的遗传多样性和遗传结构, **【拟解决的关键问题】**以期为该地区的两面针野生资源的保护和可持续利用提供可依据的资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试材于 2011 年 11 月~12 月间, 采自广西境内, 包括两面针 11 个居群和毛两面针 1 个居群 (来宾市金秀县), 共 150 个样本。采样地点的地理位置、经纬度、海拔、生境和居群样本数见表 1。采集叶片作为样本, 用硅胶干燥保存, 带回实验室用于 DNA 提取。

表 1 居群来源及每一居群的样品数目

Table 1 Locations and sample size of each studied population

居群 Population	地点 Location	经纬度 Latitude(N)/ Longitude(E)	海拔 Altitude	生境 Habitat	样品数目 Sample size	备注 Comments
hj	河池, 环江	25°45'/108°19'	285m(东:82')	山坡上, 山路边, 溪边	9	九万大山范围内
nn	南宁, 南宁市	22°49'/108°19'	78m	—	13	—
wx	来宾, 武宣	23°52'/109°36'	56m(北:0')	山坡上, 山路边, 小沟边	19	—
dl	河池, 东兰	24°30'/107°19'	340m(南西:248')	山坡上, 山路边, 林下	17	九万大山范围内
cw	梧州, 苍梧	23°34'/110°57'	220~211m(东:50'~东: 102')	山路边, 山坡上, 林下	8	攀藤状(藤质)
mjx	来宾, 金秀	24°09'/110°12'	1141m(南:168')~ 1211m	山林下, 山坡上	12	—
dwl	百色, 大王岭	23°48'/106°30'	380m(南:199')	山坡边上, 林下, 溪流边	17	灌木状(木质)直立型
ls	钦州, 灵山	22°25'/109°11'	67m(北西:290')~122 m	山路边, 山坡边, 林下	15	攀藤状(藤质)
sl	南宁, 上林	23°24'/108°38'	108m(南东:158')	山路边, 山坡边, 林下	11	灌木状(木质)直立型
lz	崇左, 龙州	22°28'/106°57'	160m(东:84')~175m	山路边, 石山下	13	灌木状(木质)直立型
zm	玉林, 樟木	22°29'/109°57'	78m	水库周围	9	—
ss	防城港, 上思	22°02'/107°59'	229m(北东:89')	山路边, 林下	7	—

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取与检测

用改良 CTAB 法提取两面针总 DNA, 在使用 CTAB 液前, 用 CTAB 空白液洗涤 1 次, 其余步骤同 CTAB 法。将 DNA 溶于 50 μL 1×TE 缓冲液, 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度, 保存于 -20℃ 冰箱中。

1.2.2 ISSR 反应条件建立

ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学公布的第 9 套序列, 由上海生工生物工程公司合成。经初步实验筛选后选择 U826 (5'-ACACACACACACACC-3') 为优化实验用的引物。

在张蕾等人^[14]的实验结果上, 增加 dNTP 这一主要因素, 设计 Mg²⁺、dNTP、引物、Taq 酶 (Takara Ex Taq) 和模板 DNA 五因素四梯度水平 (表 2), 查正交表 L₁₆ (4⁵) 进行正交组合设计 (表 3); ISSR 反应采用 25 μL PCR 反应体系, 除表 2 中的因素外, 每个反应管内还有 1×PCR Buffer。

在 BIO-RAD PCR 仪上进行扩增, 参照张蕾等人^[14]的反应程序, 稍修改为 95℃ 3min; 94℃ 1min, 52℃ 1min, 72℃ 2min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统上观察并照相。

进一步对 ISSR 反应程序中的循环次数进行单因素梯度优化筛选, 并比较循环次数对扩增条带数和清晰度的影响。循环次数设计 4 个梯度: 30 次、35 次、40 次、45 次。

表 2 反应体系正交组合各因素水平

Table 2 Orthogonal combination of each factor level for reaction system

梯度水平 Gradient levels	MgCl ₂ (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	引物 Primer (μmol/L)	Taq (U)	DNA (ng)
1	1.0	0.10	0.2	0.75	50
2	1.5	0.20	0.4	1.00	100
3	2.0	0.25	0.6	1.50	200
4	2.5	0.30	0.8	2.00	300

1.2.3 引物筛选

ISSR 共 100 条引物进行了实验和筛选, 从中选出可以扩增出多态性条带且条带清晰、重复性好的引物, 用于构建两面针变种与类型间的指纹图谱。

1.2.4 数据分析

根据 ISSR 扩增图谱进行人工读带, 以 DL2000 分子标记为基准, 同一引物具有相同的相对迁移位置视为同源。有带记为“1” (包含弱带), 无带记为“0”, 生成原始的 0, 1 二元数据矩阵。(1) 平方根法估算

遗传多样性参数: 在 GenAlEx 6.5 软件利用平方根法计算隐性等位基因频率, 并以此估算 Shannon 信息指数 (I)、Nei's 遗传距离 (D) 等。(2) 分子方差分析 (AMOVA): 在 GenAlEx 6.5 软件中进行基于遗传分化系数 G_{st}, 根据公式 $N_m \approx 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$ ^[18] 来估算居群的历史基因流。(3) 聚类分析: 根据 GenAlEx 6.5 软件计算的居群间 Nei's 遗传距离矩阵, 利用 NTSYSpc 2.1^[19] 软件中的 SAHN 模块进行非加权组平均法 (UPGMA) 聚类, 构建树状图。

表 3 反应体系正交组合设计

Table 3 Orthogonal combination design of the reaction system

实验号 No.	MgCl ₂ (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	引物 Primer (μmol/L)	Taq (U)	DNA (ng)
1	1.0	0.10	0.2	0.75	50
2	1.0	0.20	0.4	1.00	100
3	1.0	0.25	0.6	1.50	200
4	1.0	0.30	0.8	2.00	300
5	1.5	0.10	0.4	1.50	300
6	1.5	0.20	0.2	2.00	200
7	1.5	0.25	0.8	0.75	100
8	1.5	0.30	0.6	1.00	50
9	2.0	0.10	0.6	2.00	100
10	2.0	0.20	0.8	1.50	50
11	2.0	0.25	0.2	1.00	300
12	2.0	0.30	0.4	0.75	200
13	2.5	0.10	0.8	0.75	200
14	2.5	0.20	0.6	1.00	300
15	2.5	0.25	0.4	2.00	50
16	2.5	0.30	0.2	1.50	100

2 结果与分析

2.1 两面针 ISSR 反应体系的正交优化

PCR 反应中每一因素的改变均对扩增条带有影响, 并且各因素之间存在一个动态的适合浓度比例。因此, 根据 L₁₆ (4⁵) 正交表所设计的表 2 中 PCR 正交反应体系方案共有 16 个处理, 我们分别对这 16 个处理进行了 3 次的重复实验 (图 1)。

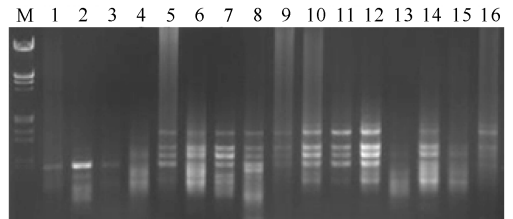


图 1 引物 U826 的正交组合设计优化 ISSR 结果

Fig. 1 Orthogonal combination design results of primer U826

注: 泳道 1~16 分别对应处理 1~16 号; M 为 Lambda DNA/ HindIII + EcoRI Markers。

Note: Lane 1~16 are corresponding of No. 1~16; M is Lambda DNA/ HindIII + EcoRI Markers.

从图 1 可以看出, MgCl₂ 浓度为 1.0mmol/L 时, 1~4 号方案均未扩增出完全的条带; MgCl₂ 浓度为

2.5mmol/L时,除了14号方案扩增的条带模糊外,13,15,16号方案也未扩增出完整的条带。此外,5号、9号条带数不多且模糊拖尾;6,8,10号的扩增结果不是很理想,条带模糊拖尾。只有7,11,12号的扩增条带是理想的,其中12号方案最清晰、最亮、最全,而且3次的实验结果均只有12号方案的电泳条带一直都是最清晰稳定的,所以12号反应体系应该是16个组合中的最佳反应体系,即在25 μ L反应体系中,模板DNA的量为200ng,10 \times *Ex Taq* Buffer(Mg²⁺ Free)的量为2.5 μ L的, MgCl₂ (25mM)浓度为2.0mmol/L, dNTP Mixture(2.5mM each)浓度为0.30mmol/L,引物浓度为0.4 μ mol/L, *TaKaRa Ex Taq* (5U/ μ L)为0.75U。

2.2 两面针 ISSR 循环次数的单因素优化

PCR反应程序的循环次数共有4个处理,分别对这4个处理也进行了3次重复实验,从图2可看出,从30~45次循环次数,电泳条带越来越清晰,越来越亮,但是当循环次数增加到45次,条带并不比40次循环的清晰和明亮,这说明扩增45个循环时扩增反应所需的因素已经反应完全,扩增的DNA浓度已经达到最大值,继续扩增下去DNA浓度也不会增加,这反而会浪费时间,而且不符合当今社会节能环保的主流。而且扩增40个循环已经能检测出很清晰、明亮的条带了,所以我们可以认为最佳的循环次数应该为40次。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C预变性3min;94 $^{\circ}$ C变性1min,52 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,共计40个循环,循环结束后在72 $^{\circ}$ C延伸10min。

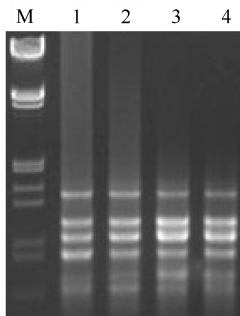


图2 引物U826的单因素优化循环次数结果

Fig. 2 Single factor optimization cycles using primer U826

注:泳道1~4分别对应35,40,45,50次循环;M为*Lambda* DNA/*Hind*III + *Eco*R I Markers。

Note: Lane 1~4 represents the cycle 35, 40, 45, 50, respectively; M is *Lambda* DNA/ *Hind*III + *Eco*R I Markers.

2.3 ISSR 扩增多态性及居群遗传多样性

从100条ISSR引物中筛选得到8条能扩增出清晰、稳定、丰富的多态性条带的引物(表4,图3),运

用优化好的体系和这8条引物对广西两面针11个居群进行扩增,共扩增出63个条带,都为多态性条带,多态位点百分率(P)为100%,每条引物扩增4~16个条带不等,平均每条引物扩增7.815条,条带片段大小分布在250~2000bp。

多态位点百分率(P)是目前应用最为广泛的多样性指标,居群对环境适应能力的强弱与多态位点百分率成正比,居群的多态位点越多说明其对环境的适应能力越强,在环境中具有越强的竞争力;反之,其适应环境的能力越弱,在进化过程中被淘汰。广西11个两面针自然居群中,单个居群的多态位点百分率变化范围为18.75%~67.19%,由大到小依次为环江(hj)>龙州(lz)>灵山(ls)>武宣(wx)>东兰(dl)>南宁(nn)>上林(sl)>大王岭(dwl)>上思(ss)>苍梧(cw)>樟木(zm)(表5)。说明河池环江两面针居群多态性最为丰富,遗传基础最好,适应环境能力最强,玉林樟木居群的环境使用能力最弱。

Nei's 基因多样性指数(He)又称基因多样性,代表了基因多样性的程度,Shannon 信息指数(I)代表了遗传多样性的程度。Shannon 信息指数结果显示在物种水平上为0.356,各居群的在0.097~0.322,其中最高的为河池环江(hj)居群(0.322),最低的为梧州苍梧(cw)居群(0.097);两面针各个居群及物种水平上的基因多样性(He)与其Shannon指数的结果基本相符(表5),各居群平均值为0.117,物种水平上的为0.227。根据Hamrick等^[20]对165个属449个物种共653篇等位酶研究论文的统计分析表明,不同类型植物的遗传变异和居群遗传中的基因多样性指数平均值为0.177,多态位点比例平均值0.647。将本研究结果与上述结果比较可以看出,两面针在物种水平上遗传多样性较高。

表4 ISSR 分析中优选的8条引物及扩增结果

Table 4 Amplification results of 8 primers used for ISSR analysis

引物 Primer	引物序列 5'-3' Sequence(5'-3')	条带数 No. of bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands
U825	(AC) ₈ T	10	10
U826	(AC) ₈ C	15	15
U841	(GA) ₈ YC	6	6
U842	(GA) ₈ YG	6	6
U855	(AC) ₈ YT	4	4
U856	(AC) ₈ YA	5	5
U857	(AC) ₈ YG	10	10
U861	(ACC) ₆	7	7
总计 Total		63	63
平均 Mean		7.875	

注:H=(A,C或T),V=(A,C或G),R=(A或T),Y=(C或G)。Note:H=(A,C or T),V=(A,C or G),R=(A or T),Y=(C or G)。

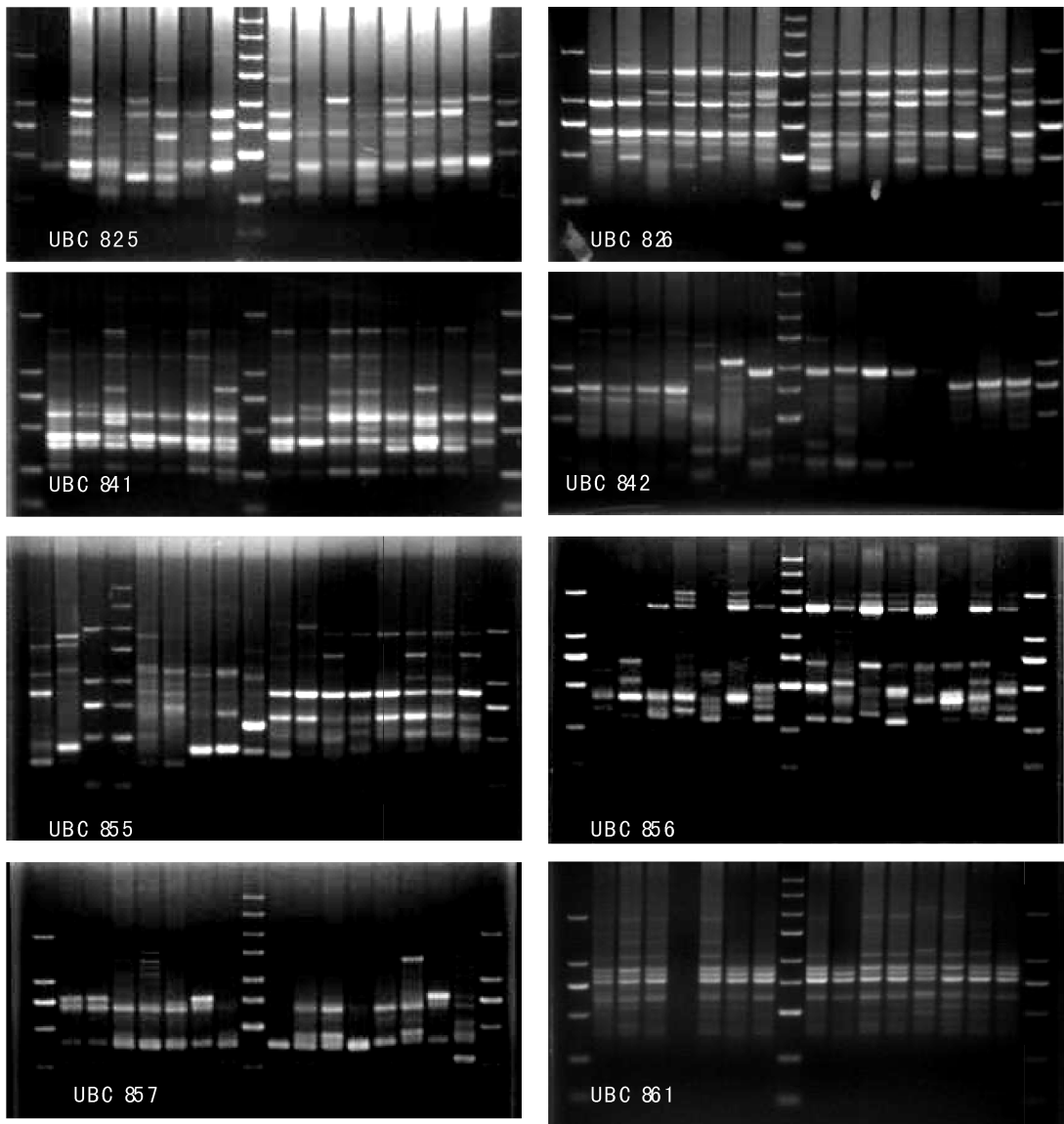


图 3 8 条 ISSR 引物扩增带型

Fig. 3 Amplified banding patterns of 8 ISSR primers

表 5 11 个居群的遗传变异(平均值±标准差)

Table 5 Genetic variation of 11 natural population (Mean±SD)

居群 Population	等位基因数 N	差异等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon's 信息指数 I	期望杂合度 H_e	无偏差期 望杂合度 uH_e	多态位点 百分率 $P(\%)$
hj	9	1.413±0.112	1.360±0.048	0.322±0.034	0.211±0.025	0.224±0.026	67.19
nn	13	0.857±0.115	1.197±0.042	0.174±0.033	0.115±0.023	0.120±0.024	34.38
wx	19	0.984±0.116	1.204±0.041	0.189±0.033	0.123±0.022	0.126±0.023	40.63
dl	17	0.984±0.114	1.225±0.046	0.193±0.034	0.129±0.024	0.132±0.025	39.06
cw	8	0.714±0.102	1.108±0.034	0.097±0.026	0.063±0.018	0.067±0.019	21.88
dwl	17	0.762±0.105	1.143±0.038	0.126±0.030	0.083±0.021	0.086±0.021	25.00
ls	15	1.016±0.119	1.220±0.040	0.208±0.033	0.136±0.023	0.140±0.023	43.75
sl	11	0.889±0.111	1.156±0.035	0.151±0.030	0.097±0.020	0.102±0.021	32.81
lz	13	1.238±0.117	1.278±0.043	0.258±0.034	0.169±0.024	0.175±0.025	56.25
zm	9	0.508±0.101	1.131±0.039	0.105±0.029	0.072±0.021	0.076±0.022	18.75
ss	7	0.667±0.106	1.162±0.041	0.133±0.032	0.091±0.022	0.098±0.024	23.44
平均 (Mean) (H_s)	12.545	0.912±0.035	1.199±0.012	0.178±0.010	0.117±0.007	0.122±0.007	36.65±4.53
物种水平 Species level (H_T)	138	2	1.372±0.044	0.356±0.030	0.227±0.022	0.228±0.022	100

2.4 居群遗传结构分析

居群遗传分化的分子方差分析(AMOVA)表明,本研究两面针居群间差异达极显著($p < 0.001$),分化指数(G_{st})为 0.490。Buso 认为分化指数介于 0~0.05 说明分化很弱,0.05~0.15 是中化,0.15~0.25 是分化大,大于 0.25 表明分化极大^[21],据此,广西两面针自然居群之间分化极大。总变异中的 49.0% 的变异存在于居群间,居群内的遗传变异占总遗传变异的 51.0%(表 6),表明居群间与居群内的遗传分化基本持平,对遗传变异所起的作用大致相当。

基因流的大小主要决定于花粉流或种子流等^[22]。居群遗传学研究中,基因流根据 Nm 的大小划分为高(≥ 1.0)、中(0.250~0.99)、低(0.0~0.249)3 个等级水平^[22]。基于遗传分化系数 G_{st} 估算的居群历史基因流 $Nm=0.52$,表明其基因流水平中等偏低,居群间基因交流较为贫乏,居群间的遗传分化程度较高。

2.5 遗传一致性、遗传距离及聚类分析

遗传距离是评价居群之间遗传分化程度和亲缘关系远近的重要指标,遗传距离越小,越接近于“0”,表明居群之间的遗传分化程度越小,亲缘关系越近;反之,遗传分化程度越大,亲缘关系越远。广西两面针 11 个自然居群之间的 Nei's 遗传一致性在 0.712~0.948,其中居群河池环江(hj)和南宁(nn)以及南

表 6 两面针分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 6 AMOVA analysis of the genetic variances among populations of *Zanthoxylum nitidum*

变异来源 Source of variation	自由度 d. f.	总方差 SS	均方差 MS	变异组成 Est. Var	总变异百分率 P (%)	G_{st}	p
居群间 Among Pops	10	509.419	50.942	3.781	49	0.490	<0.001
居群内 Within Pops	127	503.436	3.964	3.964	51		<0.001
总体 Total	137	1012.855	—	7.745	100		

表 7 居群间 Nei's 遗传相似度(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table 7 Nei's genetic identity (above diagonal) and Nei's genetic distance (below diagonal) between different populations

居群 Population	hj	nn	wx	dl	cw	dwl	ls	sl	lz	zm	ss
hj	—	0.948	0.929	0.930	0.782	0.844	0.916	0.902	0.906	0.824	0.878
nn	0.053	—	0.946	0.948	0.803	0.851	0.902	0.938	0.909	0.819	0.893
wx	0.073	0.055	—	0.921	0.763	0.810	0.897	0.890	0.877	0.835	0.854
dl	0.072	0.053	0.082	—	0.772	0.870	0.888	0.932	0.929	0.804	0.847
cw	0.246	0.219	0.270	0.259	—	0.712	0.869	0.800	0.813	0.826	0.748
dwl	0.170	0.162	0.211	0.140	0.340	—	0.844	0.878	0.856	0.752	0.801
ls	0.087	0.103	0.109	0.118	0.140	0.169	—	0.895	0.881	0.836	0.848
sl	0.103	0.064	0.117	0.071	0.224	0.130	0.111	—	0.943	0.814	0.901
lz	0.099	0.095	0.131	0.073	0.207	0.155	0.127	0.059	—	0.837	0.866
zm	0.193	0.199	0.180	0.218	0.191	0.285	0.179	0.206	0.178	—	0.787
ss	0.130	0.114	0.158	0.166	0.291	0.222	0.165	0.104	0.144	0.240	—

宁(nn)和河池东兰(dl)间的遗传相似性最大,为 0.948;居群梧州苍梧(cw)和百色大王岭(dwl)间的遗传相似性最小,为 0.712。11 个居群的遗传距离在 0.053~0.334(表 7)。Mantel 检验发现遗传距离和地理距离没有显著的相关性($r=0.391$, $p=0.040$)(图 4)。

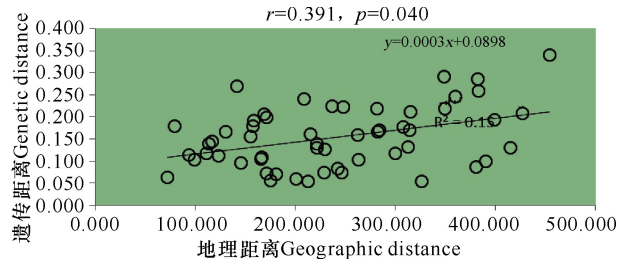


图 4 两面针居群地理距离与遗传距离相关性的 Mantel 检验

Fig. 4 Correlation between geographic distance and genetic distance revealed by Mantel test

根据数量分类的原理,亲缘关系越近的类型越早聚为一类;反之,亲缘关系越远,越晚聚在一起。以毛两面针为外类群,采用 UPGMA 法聚类,从树状图(图 5)上可以看出,毛两面针最先从居群间分出,与物种划分结果一致;两面针 11 个居群可以分为两个大类,第一大类包括玉林樟木和梧州苍梧类群,其余居群聚为第二类。聚类结果与地理分布无关。

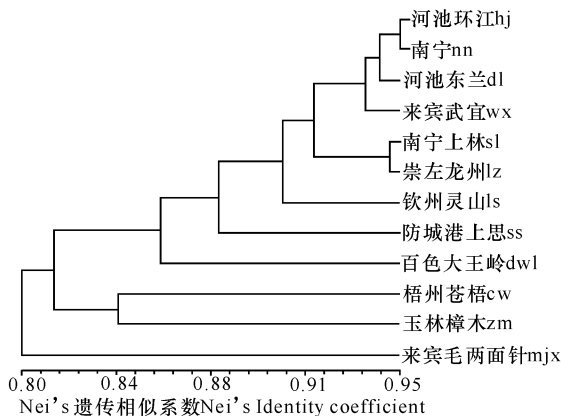


图5 居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类

Fig. 5 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance

3 讨论

3.1 两面针居群遗传指数分析

3.1.1 遗传多样性

多态位点百分率是遗传多样性评价的重要指标,反映了居群对环境的适应能力。通过 ISSR 分子标记技术对两面针居群遗传多样性进行分析表明,物种水平上,多态位点百分率为 100%,说明两面针整个物种对环境的适应能力很强;各个居群的多态位点百分率在 18.75%~67.19%,总多态性位点百分率高于各个居群的,居群与居群之间有较大的位点差异。本研究结果与花椒属其他物种居群遗传多样性结果相似^[23,24],表明广西两面针自然居群在物种水平上拥有较高的遗传多样性,但相互之间的基因交流较少。

3.1.2 居群遗传结构和遗传分化

通过对两面针居群间和居群内的 AMOVA 分析,其遗传分化指数(G_{st})为 49%,居群内的基因变异占 51%,居群间的基因变异占 49%,基因流为 0.52,居群间与居群内的遗传分化基本持平,居群间基因交流较为贫乏。这与两面针的生物学特性和分布状况有关:两面针为多年生木质藤本植物,林下更新能力较弱^[7],限制了居群内个体之间遗传多样性的丰富和居群之间杂交引起的基因漂流和遗传多样性增加;广西两面针种质资源丰富,分布极为广泛^[7],使得每个居群都有适应其微环境的能力,物种水平上具有更高的遗传多样性。

3.1.3 聚类分析

广西两面针 11 个自然居群之间的 Nei's 遗传一致度在 0.712~0.948,遗传距离在 0.053~0.334,表明两面针各个居群之间差异性较大,在未来的进化过程中有可能会产生新品种。Mantel 检验发现遗传距

离和地理距离没有显著的相关性,表明地理距离在两面针居群遗传分化中的作用不太明显。根据居群间的遗传相似度的计算以及居群间的 UPGMA 聚类结果,也表明地理距离较近的居群并不总是遗传相似性也高或聚类在一起。毛两面针和两面针 11 个居群各自聚为一支,体现出在物种范围上,毛两面针和两面针差异最大,可将 ISSR 分子标记技术作为物种鉴定的辅助手段。

3.2 广西两面针种质资源的保护

遗传多样性是指居群内或者其样本中遗传变异的多态性,是生物生存质量评判的依据之一。居群的遗传多样性水平和居群遗传结构与其适应性和进化潜力密切相关,受生活型、繁殖方式、分布范围和环境等因素的共同影响。对不同居群的遗传多样性研究,可以揭示不同居群的变异程度和变异规律,判断居群的生存状况,为种质资源的收集与保存以及优良性状的选择提供理论依据。

本研究通过对广西 11 个两面针自然居群进行 ISSR 分子标记分析,显示在物种水平上,所采样本的基因组 DNA 多态性程度较高,表明两面针对其生存环境有很强的适应能力。在采样过程中发现两面针分布零星且数量较少,一方面是由于其自然繁殖率低,另一方面也说明了当地居民缺乏保护意识,导致两面针自然资源数量减少。

在药用资源的利用及遗传多样性保护方面提供以下建议:结合形态、生理、化学及分子证据,加强居群内和居群间优良药用资源的筛选和培育,着力建设道地性药材基地;就地保护是两面针资源保护的首选,选择个体数量多、居群内变异系数大,自然环境不易受到人为影响的天然居群进行保护。

4 结论

本研究以两面针叶片为实验材料,通过基因组总 DNA 的提取,ISSR-PCR 反应体系的建立与优化,引物筛选,样品 ISSR-PCR 扩增和数据处理与 GenA-IEx 6.5 软件分析等一系列步骤,对分布于广西的 11 个两面针自然居群,138 份样品进行遗传多样性和聚类分析,得到以下结论:

(1)通过正交试验初步确定最优体系,然后通过单因素试验对 PCR 循环次数进行优化,得到了一套适合两面针 ISSR-PCR 扩增的最佳反应体系,即在 25 μ L 反应体系中,模板 DNA 的量为 200ng,10 \times Ex Taq Buffer (Mg^{2+} Free) 的量为 2.5 μ L, $MgCl_2$ (25mM) 浓度为 2.0mmol/L, dNTP Mixture (2.5mM each) 浓度为 0.30mmol/L,引物浓度为

0.4 μmol/L, TaKaRa Ex Taq (5U/μL) 为 0.75U。扩增程序为 94℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 1min, 52℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共计 40 个循环, 循环结束后在 72℃ 延伸 10min。

(2) 利用已优化好的反应体系, 从 100 条引物中筛选出 8 条多态性高, 扩增条带清晰, 重复性好的引物用于 138 份两面针样品的 ISSR-PCR 扩增。8 条引物共扩增出 63 条条带, 条带大小 250~2000bp, 每条引物平均扩增出 7.875 个条带, 其中多态性条带为 63 条, 占 100%, 说明两面针物种水平的遗传多样性比较丰富。河池环江居群的遗传多样性最高, 玉林樟木的遗传多样性最低。

(3) 利用 GenAlEx 6.5 软件对所得数据进行统计分析, 在物种水平上, 两面针的多态位点百分率为 100%, 基因多样性指数为 0.227, Shannon 信息指数为 0.356, 说明在物种水平上具有较高的遗传多样性。遗传分化系数为 0.490, 居群内变异占 51%, 居群间变异占 49%, 居群间基因流为 0.52, 居群间与居群内的遗传分化基本持平, 居群间基因流动有限。

(4) 居群间的聚类及 Mantel 检验 ($r = 0.391$, $p = 0.040$) 均表明广西两面针居群地理距离与遗传距离之间的相关性不明显。从树状图上可以看出, 外类群毛两面针最先从居群间分出, 与物种划分结果一致。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
China Flora Editorial Board of CAS. China Flora[M]. Beijing: Science Press, 1997.

[2] 国家中医药管理局(中华本草)编委会. 中华本草(第 4 部)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
Editorial Committee of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica(4th)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999.

[3] 颜玉贞, 谢培山, 田润涛, 等. 两面针药材 HPLC 色谱指纹图谱分析与质量评价[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(6): 440-443.
Yan Y Z, Xie P S, Tian R T, et al. HPLC fingerprinting analysis and quality assessment of herbal drug *Radix Zanthoxylum nitidii* [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2006, 17(6): 440-443.

[4] 中国药科大学. 中药辞海[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
China Pharmaceutical University. Chinese Medicine Dictionary[M]. Beijing: The Medicine Science and Technol-

ogy Press of China, 1993.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China(1 th)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.

[6] 孙世荣, 蒋水元, 胡永志, 等. 两面针繁殖技术研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(16): 6787-6789.
Sun S R, Jiang S Y, Hu Y Z, et al. Study on propagation technique of *Zanthoxylum nitidum* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(16): 6787-6789.

[7] 余丽莹, 黄宝优, 谭小明, 等. 广西两面针野生种质资源调查研究[J]. 广西植物, 2009, 29(2): 231-235.
Yu L Y, Huang B Y, Tan X M, et al. Survey of wild germplasm of *Zanthoxylum nitidum* in Guangxi [J]. Guihaia, 2009, 29(2): 231-235.

[8] 刘华钢, 李丹妮, 刘丽敏. 氯化两面针碱抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 广西科学院学报, 2009, 25(3): 187-191.
Liu H G, Li D N, Liu L M. Research progress on the antitumour mechanism of nitidine chloride [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2009, 25(3): 187-191.

[9] Tillequin F. Rutaceous alkaloids as models for the design of novel antitumor drugs [J]. Phytochemistry Reviews, 2007, 6(1): 65-79.

[10] Jian S, Zhong Y, Liu N, et al. Genetic variation in the endangered endemic species *Cycas fairylakea* (Cycadaceae) in China and implications for conservation [J]. Biodiversity & Conservation, 2006, 15(5): 1681-1694.

[11] 邹瑜, 杨柳, 黄大辉, 等. 70 份毛葡萄种质资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 1943-1948.
Zou Y, Yang L, Huang D H, et al. Genetic diversity of 70 *Vitis heyneana* germplasms revealed by SSR markers [J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(12): 1943-1948.

[12] 马新业, 刘锋, 詹若挺, 等. 两面针与混伪品及近缘种 DNA 条形码鉴定研究[J]. 南方农业学报, 2014, 45(1): 12-17.
Ma X Y, Liu F, Zhan R T, et al. Identification of *Zanthoxylum nitidum* and its adulterants and related species through DNA barcodes [J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(1): 12-17.

[13] 李艳芝, 王慧云. 两面针化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2013, 24(31): 2966-2968.
Li Y Z, Wang H Y. Progress in the research on chemical constituents and pharmacologic activities of *Zanthoxylum nitidum* [J]. China Pharmacy, 2013, 24(31): 2966-2968.

[14] 张蕾, 严萍, 韩正洲, 等. 两面针 ISSR-PCR 反应体系的

- 建立及优化[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 70-74.
- Zhang L, Yan P, Han Z Z, et al. Establishment and optimization of ISSR - PCR system for *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 29(1): 70-74.
- [15] Flores C, Delaveau C, Alvarez C, et al. Genetic variation within three populations of *Phycella australis* (Phil.) Ravenna from Biobío Region, Chile, evaluated using ISSR markers [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2013, 73(1): 77-81.
- [16] Ding G, Zhang D, Yu Y, et al. Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and implications for conservation [J]. Plant Systematics and Evolution, 2013, 299(1): 131-138.
- [17] Thul S T, Srivastava A K, Singh S C, et al. Genetic and chemical diversity of high mucilaginous plants of *Sida* complex by ISSR markers and chemical fingerprinting [J]. Molecular Biotechnology, 2011, 49(1): 77-81.
- [18] Mcdermott J M, Mcdonald B A. Gene flow in plant pathosystems [J]. Annual Review of Phytopathology, 1993, 31(1): 353-373.
- [19] Rolhf F. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2. 1[S]. New York; Exeter Software, Setauket, 2000.
- [20] Hamrick J, Godt M, Brown A, et al. Allozyme diversity in plant species [J]. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources, 1990: 43-63.
- [21] Buso G, Rangel P, Ferreira M. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumapatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. Molecular Ecology, 1998, 7(1): 107-117.
- [22] Govindaraju D R. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants [J]. Oikos, 1988: 31-35.
- [23] 李猛. 蚬壳花椒遗传多样性 ISSR 研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013.
- Li M. The research of ISSR on genetic diversity of *Zanthoxylum dissitum* Hensl [D]. Changsha: Central Southe University of Forestry and Technology, 2013.
- [24] 汉素珍. 花椒种质资源 ISSR 研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- Han S Z. ISSR research of germplasm resources of *Zanthoxylum bungeanum* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011.

(责任编辑: 陈小玲)

(上接第 540 页 Continue from page 540)

- [5] 蒋日红. 广西中越边境蕨类植物区系地理学研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2011.
- Jiang R H. Studies on the Pteridophyte Flora and Phytogeography of Sino-Vietnamese border [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2011.
- [6] 秦仁昌. 中国蕨类植物科属的系统排列和历史来源 [J]. 植物分类学报, 1978, 16(3): 1-19.
- Qin R C. Fern families and genera in China; Their system of arrangement and historical origin [J]. Journal of Systematics and Evolution, 1978, 16(3): 1-19.
- [7] 覃海宁, 刘演. 广西植物名录 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- Qin H N, Liu Y. A Checklist of Vascular Plants of Guangxi [M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [8] 陆树刚. 中国蕨类植物区系概论 [C] // 李承森. 植物科学进展. 北京: 科学出版社, 2004, 6: 29-42.
- Lu S G. An Outline of the Chinese Pteridoflora [C] // Li C S. Advances in Plant Science. Beijing: Science Press, 2004, 6: 29-42.
- [9] 陆树刚. 蕨类植物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- Lu S G. Pteridology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.
- [10] 吴望辉. 广西弄岗国家级自然保护区植物区系地理学研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2011.
- Wu W H. Studies on the Flora and Phytogeography of Longgang National Nature Reserve of Guangxi, China [D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2011.
- [11] 何飞. 川西植物区系地理研究与优先保护区域分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- He F. Study on Floristic Phytogeography and Analysis on Regions of Priority Conservation in western Sichuan Province, China [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009.

(责任编辑: 陆雁)