林业科学研究 2008, 21(6): 768～772
Forest Research

文章编号: 1001-1498(2008)06-0768-05

红花石蒜遗传多样性的 ISSR分析

左 慧[1,2], 杨志玲[1*], 杨 旭[1], 谭梓峰[1], 于华会[1]

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所,浙江 富阳 311400; 2. 中南林业科技大学,湖南 长沙 410004)

摘要:利用 ISSR分子标记技术对 14个居群的红花石蒜进行遗传多样性研究,结果表明: POPGEN32分析显示红花石蒜物种的遗传多样性很高,多态位点百分率为 92.31%, Shannon指数 (H)为 0.459 7, Nei指数 (I)为 0.302 5;居群水平的遗传多样性较低,多态位点百分率平均为 49.65%, Shannon指数 (H)平均为 0.262 0, Nei指数 (I)平均为 0.176 3;居群间的遗传分化系数 (G_{st})为 0.503 5,基因流 (N_m)为 0.698 3。AMOVA分子变异分析显示:居群间遗传分化程度高, 46.12%的变异发生在居群内, 53.88%的变异发生于居群间。生境的片段化使居群间的基因流受阻,可能是居群间高遗传分化和居群水平低遗传多样性的主要原因。

关键词:红花石蒜; ISSR;遗传多样性;遗传结构;遗传分化

中图分类号: S682.2+9 **文献标识码**: A

Analysis of Genetic Diversity in *Lycoris radiata* Using ISSR Marker

ZUO Hui[1,2], *YANG Zhi-ling*[1], *YANG Xu*[1], *TAN Zi-feng*[1], *YU Hua-hui*[1]

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China;
2. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hu'nan, China)

Abstract: The genetic diversity of 14 *Lycoris radiata* populations was analyzed by ISSR markers. The results of POPGEN32 analysis showed that at species level, the percentage of polymorphics was 92.31%, Shannon's index (H) was 0.459 7, and Nei's gene diversity (I) was 0.302 5, indicating a high level of genetic diversity. But at population level, they were 49.65%, 0.262 0 and 0.176 3, respectively, suggesting a low level of genetic diversity. And the gene differentiation coefficient (Gst) and gene flow (N_m) among the populations were 0.503 5 and 0.698 3, respectively. The analysis of molecular variance (AMOVA) demonstrated that there was a relatively high level genetic variation (46.12%) among the populations, and there was relatively low genetic variation (53.88%) within the populations. The high genetic differentiation among populations and the low genetic diversity within populations could be attributed to the habitat fragmentation and the limited gene flow among populations.

Key words: *Lycoris radiata*; ISSR; genetic diversity; genetic structure; genetic differentiation

红花石蒜 (*Lycoris radiata* (L'Her.) Herb.)是石蒜科 (Amaryllidaceae)石蒜属 (*Lycoris* Herb.)植物的一种,为多年生草本植物。红花石蒜在我国分布广泛,但一直处于野生状态[1],近年来其观赏和药用价值被越来越多的专家所认可[2-7],资源需求较大。红花石蒜的园艺观赏价值、药用提取方法以及

收稿日期: 2007-12-03

基金项目: 国家科技部公益性林业专项"南方林源多用途药用植物种质保护和选育技术"(200704022)、浙江省林业厅财政补助专项"林药(石蒜)生态经济型培育模式关键技术研究与示范"(07A03)、浙江省重点农业项目"药用红花石蒜优质资源选育、野生驯化培育及离体培养再生体系的建立"(2004C22041)、中国林科院亚热带林木培育实验室项目(特色药用植物专类园建设)部分内容

作者简介: 左慧(1983—),女,吉林铁岭人,硕士研究生,从事森林培育研究。硕士学习期间在中国林科院亚林所联合培养.

*通讯作者: zlyang0002@126.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

临床药理得到了追踪研究,其生长性状、驯化培育及遗传改良等相关研究也逐步引起了国内学者的重视[8-11],但是目前国内对红花石蒜资源利用还是以采集野生资源为主,导致野生资源量和遗传多样性遭到破坏。为使红花石蒜资源长期得到可持续利用,有必要对红花石蒜的遗传多样性进行分析和评价[11]。

ISSR (Inter-simple sequence repeat)分子标记即锚定简单重复序列,是一种利用 PCR扩增进行检测的 DNA标记,所用的引物是基于简单序列重复而设计的寡核苷酸引物,用来检测 2个 SSR之间的一段短 DNA序列的差异。与 RAPD等技术相比, ISSR标记的实验稳定性更好,检测到的多态性更高[12],目前已广泛应用于玉米 (*Zea mays* L.)、油菜 (*Brassica napus* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、红薯 (*Ipamoea batalas* (Linn.) Lam.)、粟 (*Setaria italica* (L.) Beauv. var. *germanica* (Mill.) Schred.)等植物的遗传多样性或居群鉴定等研究[13-18],并在长筒石蒜 (*Lycoris longituba* Y. Hsu et Q. J. Fan)上取得了一定的研究进展[1],但总体报道不多。本文采用 ISSR分子标记对 14个红花石蒜居群进行了居群间和居群内遗传多样性分析,为红花石蒜遗传资源的保存、测定、评价提供了依据,可为红花石蒜药用或园艺新居群选育、种质资源保护和开发等提供重要参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

2003—2005年,在浙江、四川、江西、湖南、江苏、福建、贵州、安徽 8个省的 14个产地 (表 1)收集红花石蒜球茎,并对球茎进行处理,种植于中国林科院亚热带研究所后山上,待其长出幼嫩叶片,每个居群取 15个个体,计 210个样本,采其叶片装于保鲜袋中,用冰盒带回, -20 ℃低温冰箱保存,供 DNA提取。

表 1　14个产地的地理气候因子

产地	纬度 (N)	经度 (E)	年均气温 /℃	日照时数 /h	年降水量 /mm
浙江遂昌	28°13′～28°49′	118°41′～119°30′	16.2～17.6	1 325.0～2 130.0	1 039.0～2 158.0
浙江金华	28°32′～29°41′	119°14′～120°46′	17.3～18.2	1 528.8～1 808.9	1 109.0～1 305.2
浙江瞿州	28°15′～28°53′	118°22′～118°48′	20.2～24.0	1 900.0～2 226.0	1 600.0～1 716.4
浙江临安	29°56′～30°23′	118°51′～119°52′	15.8～17.1	1 847.3～1 939.0	1 400.0～1 500.0
浙江庆元	27°25′～27°51′	118°50′～119°30′	17.0～18.0	1 774.0～1 988.0	1 571.0～1 760.0
四川德阳	30°31′～31°42′	103°45′～105°15′	15.0～17.0	1 000.0～1 300.0	900.0～950.0
江西分宜	27°33′～28°08′	114°29′～114°51′	16.8～17.4	1 291.2～1 655.4	1 594.8～1 643.6
江西安福	27°04′～27°36′	114°62′～114°47′	17.4～17.7	1 649.0～1 700.0	1 553.0～1 640.5
湖南祁阳	26°02′～26°51′	110°35′～112°14′	17.8～18.4	1 613.1～1 623.0	1 150.0～1 350.0
湖南洪江	26°59′～27°29′	109°32′～110°31′	17.0～17.6	962.0～1 452.0	1 160.0～1 450.0
江苏南京	31°14′～32°37′	118°22′～119°14′	16.7～20.4	1 900.0～2 430.0	1 000.0～1 158.0
福建建宁	26°32′～27°06′	116°30′～117°03′	11.0～17.0	1 913.5～2 161.5	1 700.0～2 000.0
贵州榕江	25°36′～26°27′	108°04′～108°44′	15.2～21.2	1 312.6～1 429.7	1 200.0～1 251.0
安徽东至	29°34′～30°30′	116°39′～117°18′	11.9～16.1	2 009.8～2 055.1	1 644.6～1 763.5

1.2　研究方法

1.2.1　总 DNA提取　采用改良 CTAB法提取红花石蒜总 DNA。将 DNA溶于 0.1 ×TE缓冲液,用 1%琼脂糖凝胶电泳检查 DNA的大小和完整性。

1.2.2　引物的筛选及产物的鉴定　ISSR引物是根据哥伦比亚大学提供的序列,在上海生物工程有限公司随机合成了 60个二核苷酸重复的引物,选取 5个产地的红花石蒜 DNA进行预备试验,从 60个 ISSR引物中筛选出扩增条带清晰、产物重复性好的 10个引物 (表 2), PCR反应体系为 2×10^{-5} L,包括 40 ng模板 DNA, 2×10^{-6} mol·L^{-1}引物, 2×10^{-4} mol·L^{-1}的 dNTP, 2.5×10^{-6} L的 10 ×Buffer(扩增缓冲液), 2×10^{-3} mol·L^{-1} $MgCl_2$, 1 U TaqDNA聚合酶,扩增反应在 PTC200 PCR仪中进行。

表 2　ISSR引物序列

引物代码	引物碱基序列 (5′-3′)
808	$(AG)_8C$
809	$(AG)_8G$
810	$(GA)_8T$
818	$(CA)_8G$
825	$(AC)_8T$
834	$(AG)_8YT$
835	$(AG)_8YC$
836	$(AG)_8YA$
855	$(AC)_8YT$
856	$(AC)_8YA$

扩增程序为: 94 ℃预变性 5 min,然后进入下列循环: 94 ℃变性 45 s、退火 1 min、72 ℃延伸 2 min,共计 45个循环,循环结束后 72 ℃延伸 7 min。反应产物以 DL2000DNA Marker为分子量标准,在含有

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

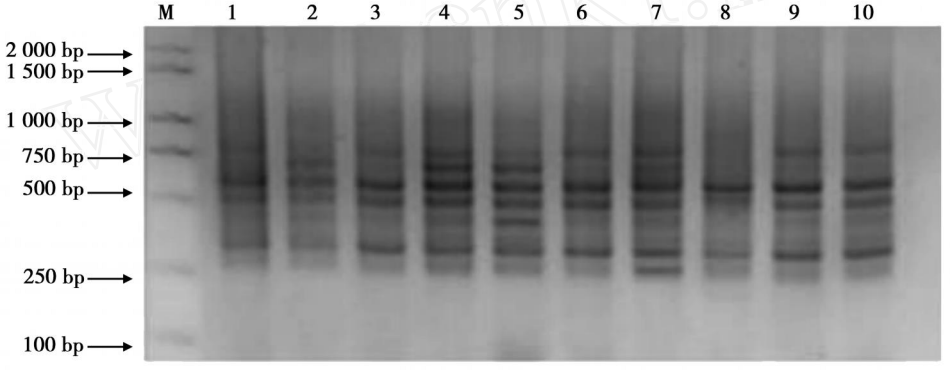
0.5 μg·mL^{-1} EB的 1.5%琼脂糖凝胶电泳中检测,用 Syngene Lp-400凝胶成像系统照相。

1.2.3 数据统计分析 ISSR扩增产物中的每一条带(统计条带有计为“1”,无计为“0”,根据软件分析需要排列成“0”、“1”矩阵)均代表了引物与模板 DNA互补的一对结合位点,可记为一个分子标记,并根据分子量标准对照反应产物在胶上的对应位置,估计扩增产物的分子量大小。采用 POPGEN32软件计算多态位点数、多态位点比率、Shannon指数 (*H*)、Nei指数 (*I*)、遗传分化系数 (G_{st})等,利用 AMOVA分子变异分析软件对其中 8个可进行方差分析的居群分析其居群间和居群内的变异情况分析。利用 SAS等常规分析软件对红花石蒜各居群地理气候因子与遗传变异指标进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 引物扩增的多态性

采用 10个 ISSR引物对 14个居群的红花石蒜共计 210个个体的 DNA样品进行 PCR扩增,共检测到 143个位点,其中 132条呈现多态性,多态性条带比率为 92.31%。Nei指数 (*I*)为 0.302 5, Shannon指数 (*H*)为 0.459 7。单个 ISSR引物扩增的条带数在 3～10条之间,产物的分子量范围为 200～1 800 bp(图 1)。



M: 分子量标准 Marker, 1～10:分别代表湖南洪江居群中的 10个单株

图 1 引物 856湖南洪江红花石蒜居群扩增结果

2.2 红花石蒜的遗传多样性水平

结果显示,供试红花石蒜居群的遗传多样性有所差异。红花石蒜的多态位点比率为 41.96%～59.44%,其中最高的是安徽东至,最低的是浙江庆元。Nei指数 (*I*)变化范围为 0.139 3～0.192 4,平均为 0.176 3; Shannon指数 (*H*)的变化范围为 0.209 5～0.284 3,平均为 0.262 0 (表 3)。从多态位点百分率、Nei指数和 Shannon指数指标可以看出,安徽东至的红花石蒜遗传变异较其他居群更加丰富,浙江庆元的红花石蒜多样性水平则较低,各居群内红花石蒜的多样性均低于总体水平,显示红花石蒜居群内的遗传多样性有下降趋势。

表 3 14个居群红花石蒜的遗传变异

编号	居群	位点总数	多态位点总数	多态位点百分率 /%	有效等位基因数	Nei指数 (*I*)	Shannon指数 (*H*)
1	浙江遂昌	143	67	46.85	1.314 5	0.178 2	0.262 0
2	浙江金华	143	70	48.95	1.292 9	0.169 1	0.252 1
3	浙江衢州	143	64	44.76	1.316 6	0.175 8	0.256 1
4	浙江临安	143	72	50.35	1.331 2	0.190 2	0.280 7
5	浙江庆元	143	60	41.96	1.238 0	0.139 3	0.209 5
6	四川德阳	143	65	45.45	1.270 4	0.157 1	0.235 3
7	江西分宜	143	75	52.45	1.297 5	0.175 9	0.264 7
8	江西安福	143	68	47.55	1.338 2	0.190 3	0.277 3
9	湖南祁阳	143	76	53.15	1.329 9	0.189 3	0.281 7
10	湖南洪江	143	77	53.85	1.320 4	0.186 9	0.280 0
11	江苏南京	143	71	49.65	1.276 9	0.161 9	0.244 1
12	福建建宁	143	68	47.55	1.313 4	0.175 9	0.258 7
13	贵州榕江	143	76	53.15	1.337 7	0.192 4	0.284 3
14	安徽东至	143	85	59.44	1.313 5	0.185 3	0.281 7
均值				49.65		0.176 3	0.262 0

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 红花石蒜居群间的遗传分化

POPGENE分析表明:供试 14个红花石蒜居群总基因多样度为 0.302 5,其中居群内基因多样度为 0.176 3,居群间的遗传分化系数 G_{st}为 0.503 5,基因流 N_m 为 0.698 3,Nei指数 (I)为 0.176 3,Shannon指数 (H)为 0.262 0。说明总的遗传变异中 50.35%存在于居群间,49.65%存在于居群内。

AMOVA分子变异分析结果 (表 4)显示,基因分化系数 Φ_{st} =0.538 8 (P <0.001),说明在总的遗传变异中,46.12%的变异发生在居群内,53.88%的变异发生于居群间。此结果与 POPGENE分析的结果一致。

表 4　8个红花石蒜居群的 AMOVA分析

变异来源	自由度	平方和	方差	变异组分	比率 /%	P^*
居群间	7	1 329.950 0	189.993	11.751 1	53.88	<0.001
居群内	112	1 357.333 3	13.726	13.726 2	46.12	<0.001

注: *为 1 000次单倍型的显著性检验。

3　小结与讨论

3.1 红花石蒜的遗传多样性

红花石蒜分布区域广泛,该属植物全世界有 20多种,我国有 17种,其中有 12种为特有种。国内红花石蒜资源基本上处于野生状态,分布于长江流域至华东、华南、西南、西北地区等 16个省区,环境复杂多样,相对于其他特有种常具有较高的遗传多样性,在长期的自然选择条件下形成了种内丰富的遗传变异。从 ISSR-PCR扩增的结果看,利用 ISSR标记检测到的红花石蒜居群总的多态位点百分率 (多态性条带比率)为 92.31%,Shannon指数 (H)为 0.459 7,Nei指数 (I)为 0.302 5,说明该物种水平遗传多样性处于较高水平。相对于物种水平而言,红花石蒜各居群的遗传多样性较高,平均多态位点百分率为 49.65%,Nei指数 (I)为 0.176 3,Shannon指数 (H)为 0.262 0;红花石蒜不同居群内遗传多样性水平低于红花石蒜物种的整体水平,说明遗传变异主要存在于居群间。这种变化趋势的形成,主要是以下两方面原因:一是红花石蒜适于生长在林下、荫蔽、湿度较大的空间或沟渠之处,且具有以球茎分裂为主的无性繁殖等生物学特性;二是由于人类活动日益频繁,植被破坏严重,对野生红花石蒜资源盲目采挖,导致野生红花石蒜居群数量和规模不断变小,使红花石蒜局限于小区域内,而居群变小的两个遗传学后果是增加了遗传漂变和近交的作用,通过近交衰退和杂合度的降低来影响个体的适合度,进而导致遗传多样性的散失。

3.2 红花石蒜的遗传结构与分化

AMOVA分子变异分析显示,8个红花石蒜居群的遗传变异中大约 53.88%存在于居群间,这表明居群间的遗传分化程度较大。基因流一向被视为是使居群遗传结构均质化的主要因素之一,具有有限基因流的物种往往较那些具有广泛基因流的物种有较大的遗传分化,因红花石蒜自然状态下以自身球茎分裂的无性繁殖为主,降低基因流,引起基因的丢失,增大遗传分化。S. Wright[19]认为居群间基因流大于 1能发挥其均质化作用,反之小于 1则表明基因流成为遗传分化的主要原因。红花石蒜的基因流 N_m 为 0.698 3,小于 1,表明总体水平的基因流较低。因此红花石蒜由于种群隔离,无性繁殖较低的基因流是居群间遗传分化的重要原因。

对 14个红花石蒜居群的遗传多样性综合指标进行比较,结果表明,安徽东至的红花石蒜遗传多样性最为丰富,江西分宜、浙江临安、贵州榕江及湖南祁阳、洪江等地区的红花石蒜遗传多样性也较高,浙江庆元的遗传多样性最低。呈片断分布的特性使这几个地区的红花石蒜居群间无法进行基因交流,由于突变、遗传漂变以及长期的自然选择的结果,导致这几个居群的红花石蒜出现了遗传分化。

3.3 红花石蒜资源的保护

物种的遗传多样性水平、生活特性以及生态学因素均影响到物种的生存发展,研究表明,红花石蒜表现较高的遗传多样性,且其适应环境能力强,因此导致其居群变小的原因可能是人为破坏,乱采滥挖所致,因红花石蒜可作为优良园林植物开发外,所含有的加兰他敏医药市场前景极好,近年来制药企业为获取最大利润,对野生红花石蒜资源大规模采集,特别是对药效成分较好的居群资源开展无度采挖,导致红花石蒜野生种质资源流失严重,资源量日益下降,红花石蒜资源的保护显得更为重要。

保护好红花石蒜的遗传资源,对于利用其遗传资源,培育药用成分含量高的新居群,解决引种栽培的实际问题具有重要意义。从本研究的结果看,安

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

徽东至、江西分宜、浙江临安、贵州榕江及湖南祁阳、洪江等地区的红花石蒜遗传多样性水平较高,是保护和利用的重点;但是红花石蒜各居群间有较大的遗传分化,基因流较低,因此也要注意其他居群的保护和利用,为居群间基因交流和重组创造条件,以更好地提高红花石蒜遗传多样性水平和对环境的适应能力。

参考文献:

[1] 邓传良,李存胜,周 坚,等. 长筒石蒜种质资源的 ISSR 研究 [J]. 河南师范大学学报:自然科学版, 2006, 34(1): 98 - 101

[2] 杨志玲,谭梓峰. 红花石蒜资源的开发利用和繁育研究建议 [J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 97 - 99

[3] 吴芳丽,李爱珍,毛慧芳. RP-HPLC 测定红花石蒜中加兰他敏含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 523 - 525

[4] 顾 萍,金庆文,丁新生,等. 氢溴酸加兰他敏治疗阿尔茨海默病的疗效观察 [J]. 实用老年医学, 2000, 14(6): 307 - 308

[5] Wilcock G K, Lilienfeld S, Gaens E. 加兰他敏治疗轻至中度阿尔茨海默病人的有效性及安全性:多中心随机对照试验 [J]. 殷剑,译. 英国医学杂志 (中文版), 2001, 4(4): 224

[6] 袁志敏, Erkinjuntti T. 加兰他敏治疗血管性痴呆及阿尔茨海默病疗效分析 [J]. 国外医学:老年医学分册, 2003, 24(6): 287

[7] Mustafa N R, Rhee K, Verpoorte R. 用 HPLC 法快速测定红花石蒜科植物中的加兰他敏 [J]. 靳朝东,译. 国外医药:植物药分册, 2005, 20(1): 26

[8] 杨志玲,谭梓峰,杨 旭,等. 施肥对红花石蒜干物质积累和分配的影响 [J]. 中南林学院学报, 2006, 26(6): 150 - 154

[9] 李玉萍,张庆峰,汤庚国. 红花石蒜 (*Lycoris radiata*)种球的繁殖试验 [J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2003, 29(2): 103 - 105

[10] 张 露,曹福亮. 红花石蒜属植物栽培技术研究进展 [J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(3): 375 - 378

[11] 杨志玲,冯刚利,谭梓峰,等. 红花石蒜 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(4): 509 - 512

[12] Wolf N G, Lage J M. Genetic analysis of gestational trophoblastic disease [J]. Semin Oncol, 1995, 22: 113 - 120

[13] 程春明,石云素,宋燕春,等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 172 - 177

[14] 崔海丽,夏春镗,赵则胜. 黑稻资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 63 - 67

[15] 林郑和,陈荣冰,陈常颂,等. ISSR 分子标记在茶树遗传关系分析中的初步应用 [J]. 茶叶科学 2007, 27(1): 45 - 50

[16] 杨若林,孔 俊,吴 鑫,等. ISSR 标记在辣椒资源遗传多态性分析中的初步应用 [J]. 上海大学学报:自然科学版, 2005, 11(4): 235 - 237

[17] 李 莹,文景芝,刘春来. 大豆疫霉 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(2): 56 - 60

[18] 刘勋成,李玉媛,陈少瑜. 不同榉树种源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西部林业科学, 2005, 34(2): 43 - 47

[19] Wright S. Evolution in Mendelian population [J]. Genetics, 1931, 16: 97 - 159

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net