

## 濒危药用植物珊瑚菜遗传多样性的 RAPD 分析

王爱兰<sup>1</sup>, 李维卫<sup>2</sup>, 刘笑<sup>1</sup>

(1. 鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025; 2. 鲁东大学学报编辑部, 烟台 264025)

**摘要:** 采用 RAPD 分子标记对全国 11 个居群的 291 个珊瑚菜样本进行了遗传多样性研究。结果显示, 10 个引物共检测到 79 条清晰的谱带, 其中多样性条带 65 条, 多样性条带百分率 (PPB) 为 82.28%; POPGENE32 分析显示, 其物种水平平均有效等位基因数 ( $N_e$ ) 平均值为 2.12; Nei's 遗传多样性指数 ( $h^*$ ) 平均值为 0.35; Shannon 多样性指数 ( $I^*$ ) 平均值为 0.56; 居群水平总的遗传多样性指数 ( $H_t$ ) 为 0.51, 其中 68.63% ( $H_s=0.35$ ) 的遗传分化来自于居群内, 31.37% 的遗传分化来自于居群间 ( $G_{ST}=0.31$ ), 居群间基因流 ( $N_m$ ) 为 1.10。本研究表明野生珊瑚菜具有较高的遗传多样性, 且居群内变异大于居群间变异。由此推断珊瑚菜的濒危原因主要来源于野生生态环境的破坏, 应当加强种质资源的保护。

**关键词:** 珊瑚菜; RAPD; 遗传多样性; 基因流

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)05-0792-05

### Genetic diversity analysis of *Glehnia littoralis* populations, an endangered medicinal plant, based on RAPD molecular markers

WANG Ailan<sup>1</sup>, LI Weiwei<sup>2</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>

(1. School of Life and Sciences, Ludong University, Yantai 264025; 2. Office of Journal of Ludong University, Yantai 264025)

**Abstract:** *Glehnia littoralis*, a medical plant species, is increasingly endangered in China. In order to develop conservation strategies for this species, the genetic diversity of 291 *G. littoralis* samples of 11 populations was assessed using molecular marker RAPD. The result revealed that the 10 selected RAPD primers generated a total of 79 amplified bands, among which 65 bands were polymorphic and the percentage of polymorphic bands were 82.28%. Based on the popgene32 analysis, the effective number of alleles ( $N_e$ ) was 2.12, Nei's gene diversity ( $h^*$ ) was 0.35, and Shannon's information index ( $I^*$ ) was 0.56. At population level,  $H_t=0.51$ ,  $H_s=0.35$ , the genetic differentiation coefficient ( $G_{ST}$ ) among populations was 0.31 and the value of gene flow ( $N_m$ ) was 1.10. Results revealed that a high level of genetic variations occurred within and among populations. It was inferred that the endangered status of this species is probably due to the destruction of habitats of the wild populations rather than a loss of the genetic diversity.

**Key words:** *Glehnia littoralis*; RAPD; genetic diversity; gene flow

珊瑚菜(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.) 为伞形科(Umbelliferae)珊瑚菜属(*Glehnia* Fr. Schmidt)的多年生草本植物, 高 5~25 cm, 其繁殖方式为有性生殖, 传粉媒介以虫媒和风媒(非自花授粉)为主<sup>[1]</sup>。其根俗称北沙参, 与人参、玄参、丹参和党参并称为五参, 是一种传统的中药材。北沙参性微寒, 味甘、微苦, 归肺、胃经, 具有养阴清肺、益胃生津之功能, 用于治疗肺热烦咳、劳嗽

痰血、热病伤津口渴等症<sup>[2]</sup>。珊瑚菜的嫩茎叶均可作为蔬菜食用, 也是人们日常生活中常用的蔬菜和保健食品之一<sup>[3]</sup>。

珊瑚菜属仅有珊瑚菜一个种, 原为海滩沙生植物群落的建群种之一, 主要分布在 2 个区域: 其一是东亚珊瑚菜分布区, 主要分布在东亚地区的中国、韩国和日本 3 个国家海岸线区域的沙滩; 其二是北美珊瑚菜分布区, 主要分布在美国近海沙滩<sup>[4-6]</sup>。在

我国主要分布在河北、辽宁、山东、江苏、浙江和福建等地的海滨沙滩<sup>[7]</sup>。近年来,随着城市和港口建设需要大量用沙,生长珊瑚菜的沙滩常被挖掘,生境遭到破坏,影响繁殖生长;加上药农连年挖根,野生资源逐渐减少,分布面积越来越窄,已经处于濒临灭绝的境地,被列为中国珍稀濒危保护植物<sup>[8]</sup>,又被称作植物界的“大熊猫”。

植物遗传多样性评估是研究濒危物种保护机制的重要手段,但关于珊瑚菜种群遗传多样性的相关研究却不多见,仅见利用等位酶标记和 SRAP 分子标记的相关研究报道,对其遗传结构及其保护方面的研究还不够深入丰富、充分<sup>[9-11]</sup>。为了更好的为珊瑚菜种质资源保护提供依据,本研究采用 RAPD

分子标记技术对全国 11 个野生珊瑚菜居群的遗传变异进行分析,以期揭示其遗传多样性水平和遗传结构,为有效保护珊瑚菜种质资源提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究选取了中国境内 11 个珊瑚菜居群 291 个样本进行分析(表 1)。所有样本均来自珊瑚菜的野生居群。均为同一季节野外随机采集的珊瑚菜幼嫩叶片,利用硅胶干燥保存,其中河北居群(Pop2)约 33 个样本为野生品种迁地保护居群,具体样本编号与取样地点见表 1。

表 1 用于实验的珊瑚菜材料及其来源  
Table 1 Profiles of sampling population

样本编号 Sample No.	采样地点 Sampling location	样品数/个 Sample size	纬度 Latitude	经度 Longitude
Pop1	山东海阳 Haiyang, Shandong	30	36°41'24"	121°15'
Pop2	河北秦皇岛 Qinhuangdao, Hebei	33	39°37'12"	119°18'
Pop3	辽宁长海 I Changhai I, Liaoning	32	39°10'12"	122°19'12"
Pop4	辽宁长海 II Changhai II, Liaoning	32	39°15'36"	122°40'12"
Pop5	辽宁长海 III Changhai III, Liaoning	14	39°16'25"	122°38'47"
Pop6	辽宁瓦房店 Wafangdian, Liaoning	32	39°41'24"	121°31'48"
Pop7	辽宁庄河 Zhuanghe, Liaoning	32	39°31'12"	122°57'35"
Pop8	辽宁鲅鱼圈 Bayuquan, Liaoning	5	40°12'36"	122°4'12"
Pop9	辽宁兴城 Xingcheng, Liaoning	17	40°30'36"	120°48'36"
Pop10	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang	32	29°52'48"	122°24'36"
Pop11	山东日照 Rizhao, Shandong	32	35°26'24"	119°34'48"

表 2 10 条 RAPD 引物序列及扩增结果

Table 2 10 RAPD primer sequences, No. of loci and No. of polymorphic loci

引物名称 Primer name	引物序列/5'-3' Primer sequence	扩增带数/条 Band number of amplification	多态性带/条 Polymorphic bands	多态性百分率/% Percent of polymorphism
S83	GAGCCCTCCA	10	9	90.00
S84	AGCGTGTCTG	10	8	80.00
S85	CTGAGACGGA	9	7	77.78
S87	GAACCTGCGG	7	5	71.43
S89	CTGACGTCAC	8	7	87.50
S92	CAGCTCACGA	7	6	85.71
S94	GGATGAGACC	10	9	90.00
S95	ACTGGGACTC	6	5	83.33
S96	AGCGTCCTCC	6	4	66.67
S98	GGCTCATGTG	6	5	83.33
Total	--	79	65	82.28

### 1.2 DNA 提取及扩增

本实验采用改进的 CTAB 法<sup>[12]</sup>提取珊瑚菜基因组 DNA。采用分光光度计分析 DNA 样品的浓度和

质量,将浓度比较大的 DNA 调整至 20 ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>,放 -20℃ 冰箱备用。

对 30 条 10 碱基引物进行筛选,选取 10 条多态

性水平高、重现性好的引物用于群体的扩增,引物序列见表2。

反应条件:反应体系为25  $\mu\text{L}$ ,其中含17.25  $\mu\text{L}$  无菌双蒸水,2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  Taq Buffer, 2  $\mu\text{L}$  10 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, 2  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物, 1U Taq 酶, 1  $\mu\text{L}$  模版DNA。反应程序为94 $^{\circ}\text{C}$  预变性3 min, 然后进行40个循环:94 $^{\circ}\text{C}$  变性1min, 37 $^{\circ}\text{C}$  复性30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸1.5 min; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸8 min。PCR产物采用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,用紫外成像系统拍照并进行观察。

### 1.3 数据分析

按照清晰易辨、重复、稳定的原则对扩增条带进行统计,同一位置有条带的记为“1”、没有条带的记为“0”,以此形成0,1二元数据矩阵。用POPGENE32软件分析计算多样性条带百分率

(PPB)、Shannon 多样性指数( $I^*$ )<sup>[13]</sup>、Nei's 多样性指数( $h^*$ )<sup>[14]</sup>、遗传分化系数(Gst)、基因流(Nm)等<sup>[15]</sup>;采用NTSYS软件,基于遗传距离,采用UPGMA方法对居群进行聚类分析;采用TFPGA软件进行了Mantel检测,确定其地理距离与遗传距离的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传变异分析

凝胶电泳检测结果显示,10个引物共产生79个条带,其中多态性条带65个,所占比例为82.28%,即平均每个引物具有7.9个位点,平均多态性位点为6.5个(表2)。引物S83, S84和S94产生条带最多,分别为10个,引物S95, S96和S98产生的条带最少,分别为6个。

表3 珊瑚菜居群遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity of each population of *Glehnia littoralis*

种群 Population	$N_a^*$	$N_e^*$	$h^*$	$I^*$
Pop1	2.60	2.04	0.49	0.78
Pop2	2.60	1.76	0.39	0.67
Pop3	2.29	1.67	0.37	0.59
Pop4	1.62	1.17	0.13	0.22
Pop5	1.43	1.31	0.17	0.25
Pop6	1.52	1.34	0.19	0.28
Pop7	2.50	1.76	0.41	0.66
Pop8	2.33	1.99	0.48	0.74
Pop9	2.43	2.07	0.50	0.77
Pop10	2.14	1.62	0.30	0.49
Pop11	2.62	1.91	0.42	0.70

$N_a^*$  = 观测等位基因数 observed allelic gene number;  $N_e^*$  = 有效等位基因数 [Kimura and Crow (1964)] effective allelic gene number;  $h^*$  = 内氏(1973) 基因多样性指数 genetic diversity index;  $I^*$  = 香农信息指数 [Lewontin (1972)] Shannon's information index.

表4 遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pop1	*	0.89	0.75	0.56	0.62	0.59	0.85	0.86	0.80	0.76	0.82
Pop2	0.11	*	0.63	0.39	0.41	0.46	0.82	0.80	0.79	0.72	0.85
Pop3	0.29	0.47	*	0.92	0.92	0.91	0.83	0.82	0.73	0.76	0.73
Pop4	0.57	0.94	0.09	*	0.94	0.94	0.70	0.68	0.61	0.67	0.52
Pop5	0.47	0.90	0.08	0.07	*	0.90	0.71	0.69	0.60	0.71	0.51
Pop6	0.52	0.79	0.09	0.06	0.10	*	0.76	0.68	0.60	0.71	0.55
Pop7	0.16	0.20	0.19	0.36	0.35	0.28	*	0.89	0.84	0.91	0.87
Pop8	0.15	0.22	0.19	0.39	0.37	0.38	0.12	*	0.93	0.75	0.86
Pop9	0.22	0.24	0.31	0.50	0.52	0.52	0.17	0.07	*	0.74	0.85
Pop10	0.27	0.32	0.27	0.40	0.35	0.34	0.10	0.29	0.30	*	0.80
Pop11	0.20	0.17	0.32	0.65	0.67	0.60	0.14	0.15	0.16	0.22	*

所有引物产生的多态性比例较高, 多态性比例在 66.7%到 90%之间。其中, 引物 S83 和 S94 多态性比例最高, 为 90%, 引物 S96 多态性比例最低, 为 66.7%, 结果见表 2。

## 2.2 遗传结构及多样性分析

本研究采用 POPGENE32<sup>[15]</sup>分析了居群遗传多样性, 居群水平分析结果见表 3。结果显示, 在物种水平上, 珊瑚菜有效等位基因数<sup>[16]</sup>( $N_e$ )在 1.36~2.98 之间, 平均值为 2.12; Nei's 遗传多样性指数( $h^*$ ) 在 0.27~0.66 之间, 平均值为 0.51; Shannon 多样性指数 ( $I^*$ ) 在 0.47~1.1 之间, 平均值为 0.85。

居群总的遗传多样性指数 ( $H_t$ ) 为 0.51, 其中居群内多样性指数 ( $H_s$ ) 为 0.35, 也就是说遗传变异主要来自于居群内, 所占比例为 68.63%, 而居群间遗传变异比例为 31.37% ( $G_{st}=0.31$ )。由表 3 可知, Pop 9 居群的遗传多样性水平最高 ( $h^*=0.50$ ;  $I^*=0.77$ ), Pop4 居群的遗传多样性水平最低 ( $h^*=0.13$ ;  $I^*=0.22$ ); 居群间的基因流 ( $N_m$ ) 为 1.10, 表明居群间存在一定的基因交流。

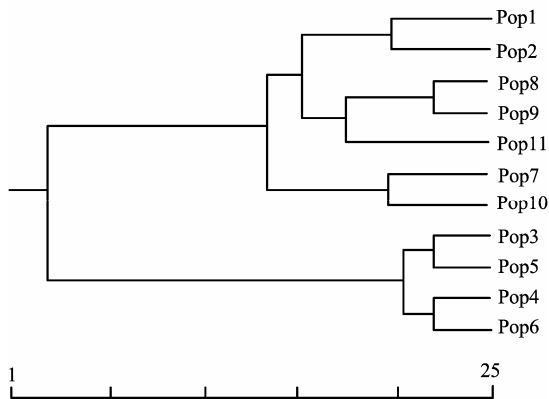


图 1 珊瑚菜 11 个居群基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类结果

Figure 1 Cluster dendrogram based on Nei's (1972) genetic distance of 11 *Glehnia littoralis* populations

## 2.3 聚类分析结果

珊瑚菜居群遗传一致度及遗传距离分析结果见表 4。由表 4 可知, Pop4 居群和 Pop6 居群遗传距离最短, 为 0.06, Pop 2 居群和 Pop 4 居群遗传距离最大, 为 0.94。

基于遗传距离的聚类分析 (图 1)显示, 11 个居群主要分为两大分支。第一个分支由 Pop1, Pop2, Pop7, Pop8, Pop9, Pop10 和 Pop11 7 个居群组成, 其中 pop1 和 Pop2 单独组成一个小分支, pop8、Pop9 和 pop11 单独组成一个小分支, pop7 和 Pop10 单独

组成一个小分支; 第二大分支由 Pop3, Pop4, Pop5 和 Pop6 4 个居群组成, 其中 Pop3 和 Pop5 聚在一起成为一个小分支, Pop4 和 Pop6 聚在一起成为一个小分支。

## 3 讨论

### 3.1 RAPD 分子标记的可行性

本研究共选取 10 个 RAPD 引物分析了 11 个野生珊瑚菜居群的遗传多样性分布。研究结果表明, 每个引物获得了较高数量的稳定、清晰、多态性高的条带, 其范围为 6~10 个, 这表明 RAPD 分子标记用来分析珊瑚菜居群的遗传多样性是可行的。

### 3.2 珊瑚菜居群的遗传结构和遗传多样性

物种的遗传结构受多种因素影响, 包括生活史、生态因子、繁育系统、生活型及分布范围等等<sup>[17]</sup>。本研究结果表明, 相比其他同类濒危物种<sup>[17-18]</sup>, 珊瑚菜具有较高的遗传多样性水平 (表 3,  $H=0.51$ ,  $I=0.85$ ), 前期的等位酶基因分析和 SRAP 分子标记分析也得出了相似的结果<sup>[9-11]</sup>。珊瑚菜居群内遗传分化水平 (68.63%) 要高于居群间分化水平 (31.37%), 表明珊瑚菜遗传变异主要发生在居群内, 其居群内遗传分化水平也高于已知其他濒危物种<sup>[19-20]</sup>。珊瑚菜是一种多年生草本植物, 生殖方式为有性生殖, 传份为虫媒, 主要传份昆虫为熊蜂, 其种子可通过风和水进行传播<sup>[10]</sup>。珊瑚菜具有复杂的繁育系统, 虽然物种分布存在不连续性和片段化, 但其生长环境主要在海边, 种子和花粉可以随风和水进行较远距离的传播, 由此推断, 珊瑚菜居群间应当存在一定的基因交流。分析结果显示, 珊瑚菜基因流 ( $N_m$ ) 为 1.1, 大于 1, 证实了此前的推断是正确的, 一定的基因流降低了居群间的遗传分化, 同时也丰富了居群内的遗传多样性。

### 3.3 珊瑚菜地理分布与遗传距离之间的关系

Mantel 检测结果还显示, 珊瑚菜遗传距离与地理分布不存在显著的正相关关系 ( $R=0.036$ ,  $P=0.418$ ), 也就是说, 遗传距离不会随着地理距离的增加而增加, 这与等位酶基因及 SRAP 分子标记研究的结果一致<sup>[9-11]</sup>。居群间遗传距离在 0.0593~0.9403 之间 (表 4), 其中遗传距离最短的为 Pop4 和 Pop6 居群, 两个居群分别来自辽宁省长海县和辽宁瓦房店市, 其地理距离并非最小; 遗传距离最大的 Pop2 和 Pop4 居群, Pop 2 来自河北秦皇岛市, Pop4 来自辽宁长海县, 其地理距离也并非最大, 产生这种结果的原因可能是因为河北秦皇岛居群属于移植样本, 由于其气候、土壤、水及其他环境因子的变

化,加上周边植被群落的改变,导致其基因型、遗传因子和居群都有一定的变化。因此,我们推断,居群间遗传变异程度与生态环境例如温度、湿度、沙质土壤及土壤 pH 值有关。遗传一致度和聚类分析也表明居群间遗传距离与其地理分布无正相关关系。

遗传多样性对于居群保持适应性进化能力具有非常重要的意义;遗传多样性的缺失通常与物种的适应性降低有直接关系。因此,物种遗传多样性的保持,是濒危物种种质资源保护的重要手段<sup>[20-21]</sup>。本研究结果表明,珊瑚菜物种濒临灭绝的主要原因可能是生境破坏以及过度采集,而非遗传多样性的降低。建议从以下几方面进行保护:(1)加强原始生境的保护;(2)严禁野生珊瑚菜品种的采挖;(3)考虑到珊瑚菜的居群内具有较高的遗传多样性水平,选择较大的居群进行就地或异地建立种质资源库也是保护该物种的一个重要举措。

#### 参考文献:

- [1] Mathias M E. Studies in the Umbelliferae I[J]. Ann Missouri Bot Garden, 1928, 15 (1): 91-109.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 92.
- [3] 毕建水, 柳玉龙, 王克凯. 珊瑚菜无公害高产高效栽培技术[J]. 中国农技推广, 2006(1): 40-41.
- [4] Hiroe M. Supplementary notes on the genus *Glehnia* (Umbelliferae)[J]. Acta Phytotax Geobot, 1962, 19: 39-44.
- [5] Hiraoka N, Chang J I, Bohm L R, et al. Furanocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild *Glehnia littoralis* in North America[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30(4): 321-325.
- [6] Sun F J, Downie R S, Hartman L R. An ITS-based phylogenetic analysis of the Perennial, Endemic Apiaceae subfamily apioideae of Western North America[J]. Systematic Botany, 2004, 29(2): 419-431
- [7] 单人骅, 余孟兰. 中国植物志(第55卷第2分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992, 55(3): 77.
- [8] 傅立国. 中国植物红皮书-珍稀濒危植物(一)[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 698.
- [9] 惠红, 刘启新, 刘梦华. 中国沿海中部珊瑚菜居群等位酶变异及其遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(3): 1-6.
- [10] Huh M, Choi J, Huh H, et al. Genetic diversity and population structure of *Glehnia littoralis*(umbelliferae) in Korea[J]. Korean Orient Phys Pathol, 2003, 17(6): 1519- 1523.
- [11] 宋春风, 刘启新, 周义峰, 等. 珊瑚菜居群遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 广西植物, 2014, 34 (1): 15-18.
- [12] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Phytochemistry Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [13] Lewontin R C. The apportionment of human diversity[J]. Evolutionary Biology, 1972, 6(38): 1-398.
- [14] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 1973, 70(12): 3321-3323.
- [15] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. Journal of Heredity, 1995, 86(3): 248-249.
- [16] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population[J]. Genetics, 1964, 49(4): 725-738.
- [17] Hamrick J L, Godt M W. Allozyme diversity in plant species[M]//Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1990: 43-63.
- [18] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(5): 1143-1155.
- [19] Hamrick J L, Godt M W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society(London), 1996, 351(1345): 1291-1298.
- [20] Avise J C, Hamrick J L. Conservation genetics: Case Histories From Nature[M]. New York, USA: Chapman & Hall, 1996: 512.
- [21] Chen F J, Wang A L, Chen K M, et al. Genetic diversity and population structure of the endangered and medically important *Rheum tanguticum* (Polygonaceae) revealed by SSR Markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2009, 37(5): 613-621.