

海南益智野生居群表型多样性分析

潘坤^{1,2}, 刘晓静², 高炳森¹, 王海燕², 王文泉^{2*}

(1. 海南医学院海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海南海口 571199; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

摘要 [目的] 分析益智野生居群间的遗传变异。[方法] 统计海南野生益智居群的平均株高、单丛茎秆数、单丛果穗数、单穗重等影响产量的形态表型数据并计算其变异系数。[结果] 居群间性状差异显著, 变异系数差异较大, 具有较丰富的遗传多样性。[结论] 可以从海南野生益智群体中筛选出一些优良性状以供益智栽培种的品种改良。

关键词 益智; 居群; 表型; 遗传多样性

中图分类号 S502.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)16-106-03

Phenotypic Diversity Analysis on Wild Populations of *Alpinia oxyphylla* Miq. of Hainan Island

PAN Kun^{1,2}, LIU Xiao-jing², GAO Bing-miao¹, WANG Wen-quan^{2*} et al (1. Hainan Provincial Key Laboratory of Research and Development of Tropical Medicinal Plants, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract [Objective] The aim was to analyze the genetic variation of wild population of *Alpinia oxyphylla*. [Method] The average plant height, stems per cluster, fruits per cluster, single panicle weight of wild population of *A. oxyphylla* in Hainan and variation coefficients were calculated. [Result] There were significant difference among traits and variation coefficients, with abundant genetic diversity. [Conclusion] Several excellent characters can be screened out from wild population of *A. oxyphylla* in Hainan for variety improvement.

Key words *A. oxyphylla* Miq.; Population; Phenotype; Genetic diversity

益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 是我国著名四大南药之一, 也是一种由中国卫生部公布的重要的药食同源植物^[1]。益智需要的栽培环境比较苛刻, 所以在我国的适宜种植地区较少, 主要分布于海南, 广东、广西和云南南部也有少量栽培, 但海南地区的质量最优, 其产量达全国的 9 成^[2]。然而经调查对比 2008 和 2015 年海南地区益智资源发现, 许多益智野生居群已经消失, 人工种植的益智出现了严重种质退化, 其结实率低、虫害严重、品质及药用特性也在不断下降^[3-5], 已经无法满足人们日益增长的消费需求。因此, 益智的种质资源保护和优良品种的培育变得更为迫切。

遗传多样性是物种涵盖的群体间和群体内个体间全部遗传变异的总和, 包括表型、生化、染色体和 DNA 等多个层次^[6]。其中, 表型就是各种形态特征的组合, 是最为直观、最易测量同时也是最容易观察和初步鉴定植物的一门科学, 所以表型的研究是最基础也是最关键的^[7]。表型多样性是遗传多样性和环境多样性的综合体现, 可以在一定程度上反映生物遗传变异的程度, 是理解物种适应机制的重要方法, 利用表型性状研究群体的遗传多样性具有简便、快速等优点, 主要通过科学有效地采样、合理的数学统计方法, 并采用形态性状、生理生化性状等变异较稳定的性状, 来揭示群体的遗传规律和变异大小, 客观评价其遗传多样性。因此表型多样性一直是研究遗传变异的一种有效手段^[6,8]。形态学性状比较容易受到环境条件影响, 多数是一些数量性状, 如株高、分支数、产量等, 因此, 通常形态学度量分析采用的是方差分析、主成分分析、聚类分析、变异系数等方式。该研究通过对

影响产量的主要性状进行统计, 并采用变异系数研究益智居群间的遗传变异程度, 为益智种质资源的保护和优良品种的有效选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 益智野生居群材料采集时间是在益智果实成熟后期进行, 采集地点在海南东南部陵水县内的吊罗山自然保护区(109°78' E、18°68' N), 随机选择 27 个居群, 因为益智植株为丛生, 因此每个居群随机选取 20 丛或 20 个植株个体测量, 不足的以实际采集个数为准, 样品经过海南医学院田建平副教授鉴定为植物益智 (*Alpinia oxyphylla* Miq.), 并将其制作成标本保存于海南医学院药学院药用植物标本室。

1.2 方法

1.2.1 性状指标 每个植株个体分别测量株高 (cm)、单丛茎秆数 (株)、单丛果穗数 (个)、单穗重 (kg)、单丛果实产量 (kg)、果实百粒重 (kg) 和果实单产 (kg/hm²), 其测量方法分别为: 株高是随机选取 20 株测量, 取平均值; 单丛茎秆数和果穗数则是随机选择 20 丛植株测量, 样品株数不够 20 个的以实际测量数量为准; 单丛果实重是通过随机选取 20 株的果实称重, 重复 3 次, 取其平均值; 果实百粒重是随机选择 100 粒果实, 重复 3 次, 取其平均值; 果实单产是由每 10 m² 面积果实产量换算而得, 重复 3 次, 取其平均值。

1.2.2 统计方法 统计计算运用软件 EXCEL 2007 和 SPSS 13.0 进行, 用变异系数的方式来表示表型性状离散程度, 其计算公式为: $CV = (SD/X) \times 100\%$, 式中, CV 表示变异系数, SD 为群体标准差, X 为群体的平均数。 CV 值越大, 表示表型间的离散程度越大、差异越大。

2 结果与分析

2.1 居群营养性性状特征 研究发现, 野生抚育的益智茎粗和株高与其干物质制造能力呈正相关性^[5]。测量益智的单丛生长个体数和株高 (图 1~2) 发现, 野生益智不同居群中,

基金项目 海南省自然科学基金 (314162); 海南医学院培育基金 (HY2014-022); 海南医学院引进人才科研启动经费。

作者简介 潘坤 (1983-), 女, 河南永城人, 讲师, 博士, 从事植物资源学和分子药理学研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事热带作物遗传分子育种研究。

收稿日期 2016-05-13

单丛生长的益智个体差别较大,株数最少的出现在采集的第14个居群内,为9株。居群13、15和26的个体数量较多,为50株,27个居群平均生长个体约30株。而27个居群的株高差异不明显,除了第25个居群的株高最低为150.5 cm外,其余的居群株高为190.8~257.1 cm,第12个居群的株高最高,27个居群平均株高约为205.9 cm。

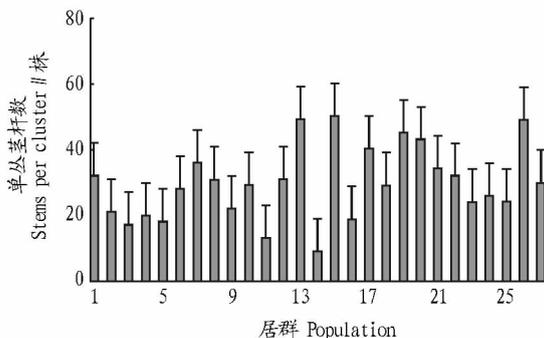


图1 益智居群内单丛茎秆数

Fig. 1 The number of stems of *A. oxyphylla* per cluster within population

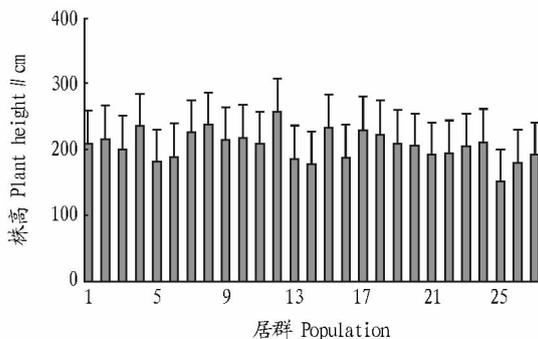


图2 益智居群内植株的平均株高

Fig. 2 Average height of *A. oxyphylla* individuals within population

2.2 居群产量性状特征 测量单丛果穗数、单穗果实平均重量、单丛果实产量发现,海南益智果实外观多为圆形或椭圆形。单丛植株的果穗数是4~42个,较高的几个居群从大到小依次为26、15、19、1、12,平均果穗为17个(图3);每个居群的单穗平均重量为0.034~0.078 kg,较高的几个居群从大到小依次为18、1、3、9、11,27个居群的平均单穗重约0.055 kg(图4);单丛产果量在0.261~1.453 kg,较高的几个居群从大到小依次为19、26、1、15、12,平均重约0.771 kg(图5)。从以上3个性状指标的测量结果可以看出,27个居群间的这3种形态差异是比较显著的($P < 0.05$),其中三项指标数值均比较高的居群有1、26和19号。

测量果实百粒重发现,除第23号居群的最低外,其余的26个居群间的重量差异不大,为0.126~0.182 kg,27个居群的平均百粒重为0.147 kg(图6);但27个居群间的果实单产差异显著($P < 0.05$),其鲜果产量为1 249.951~11 498.856 kg/hm²,平均为5 109.151 kg/hm²,从图7可以看出,除12号居群的产量最高、14号居群最低外,其余的较高产量从大到

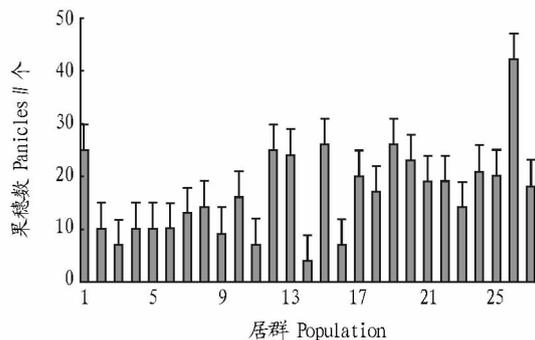


图3 益智单丛果穗数

Fig. 3 The panicle number per cluster of *A. oxyphylla*

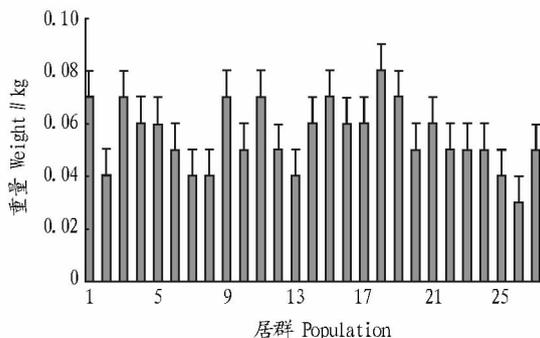


图4 益智单穗果实平均重量

Fig. 4 The average weight of single panicle of *A. oxyphylla*

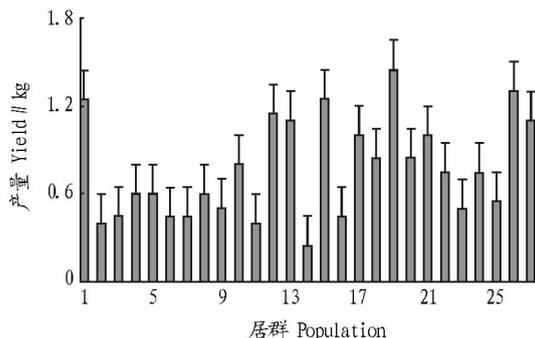


图5 益智单丛果实产量

Fig. 5 The fruit yield of *A. oxyphylla* per cluster
小依次为18、27、13、1、17。

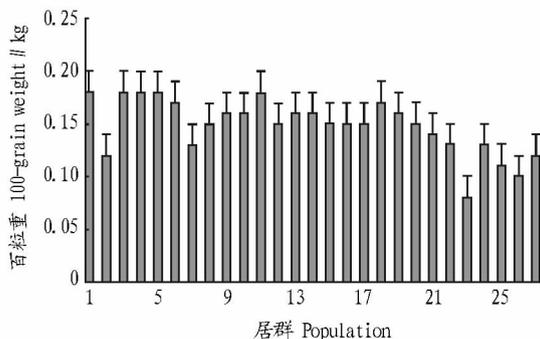


图6 益智果实平均百粒重

Fig. 6 Average 100-grain weight of *A. oxyphylla*

2.3 居群间的性状离散程度 由表1可知,几乎所有所测

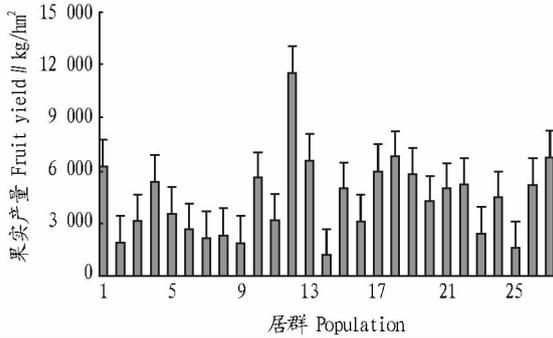


图7 益智果实单产

Fig.7 Fruit yield of *A. oxyphylla* per hectare

表1 益智野生居群主要形态性状的平均值、标准差和变异系数

Table 1 The average value, standard deviation and variation coefficient of morphological characteristics among populations of wild *A. oxyphylla*

形态性状 Morphological characteristics	材料份数 Number of material	最小值 Minimum value	最大值 Maximum value	平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 CV Variation coefficient // %
单丛茎秆数 Number of stems per cluster//株	27	9	50	30	11	33.33
株高 Plant height//cm	270	150.60	256.10	205.68	22.66	11.02
单丛果穗数 Number of panicles per cluster//个	27	4.00	42.00	17.31	8.34	48.18
单穗重 Single panicle weight//kg	81	0.03	0.08	0.05	0.01	20.00
单丛果实产量 Fruit yield per cluster//kg	27	0.25	1.45	0.78	0.34	43.59
百粒重 100-seed weight//kg	81	0.08	0.18	0.15	0.03	20.00
果实单产 Fruit yield//kg/hm ²	27	1 249.95	11 498.85	4 569.15	148.15	48.64

3 讨论与结论

居群间的变异较居群内变异更为重要,因为存在于居群间的变异反映了地理、生殖隔离上的变异,居群间的多样性变异是种内多样性的重要组成部分^[9]。而该研究表明益智居群性状离散程度高达 48.64%,因此,海南吊罗山地区益智不同居群间的形态变异相对较大,具有较为丰富的遗传多样性,这一结果同时得到了以往益智化学成分^[10-11]和 DNA 分子水平^[12-13]研究的验证。

邹颖^[14]对采集自广东、海南共 19 个野生和栽培益智居群(其中有 15 个居群来自)进行的 SSR(Single Sequence Repeats,简单重复序列)分析结果发现,其居群间的遗传分化较小,野生居群间的基因流为 1.408,栽培居群基因流为 2.076,不论是野生居群还是栽培居群基因流均大于 1。Slatkin^[15]研究指出当基因流 > 1 时,基因流就可以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群分化,表明邹颖^[14]研究的益智居群间居群分化较小;而该研究则发现海南的野生居群间的遗传分化非常明显,遗传变异水平较高(变异系数最高达 48.64%)。经对比分析得出,造成邹颖^[14]研究的益智群体间遗传分化较小的原因是:所选的栽培种种质人为引种、交流广泛,而采集的野生种居群的距离较近、地理隔离较小;该研究中所选材料是大面积随机筛选的野生益智,由于其花粉传播距离有限,这在一定程度上导致了居群间基因流受阻,因此产生了较高水平的居群间遗传分化。

经杨福孙等^[5]研究发现,在光照条件下,除果序长度与产量存在一定负相关外,其余的性状均与产量呈正相关性,特别是单株结果数表现出极显著正相关性;但在遮光条件

下,仅有单株结果数和果序长度与产量呈极显著正相关,而其他性状与产量间相关性不明显。说明光照在一定程度上影响了各性状对产量的贡献率。同时,光照条件下益智各性状的变异系数明显高于遮光处,说明光照是影响益智野生抚育产量各性状变化的主要因素,光照越强,其性状变异系数越高。而该研究从各性状的变异系数可以发现,益智单丛果穗数、单丛果实产量和单丛茎秆数是较高的,这些性状与果实单产呈正相关,其较高的变异系数可以进一步说明该研究中益智居群性状的变异可能是由于光照强度较高造成的。

综上所述,海南野生益智居群间具有较丰富的遗传多样性。这些遗传变异可能是由于受到环境因子如水分、光照、土壤等的影响而产生的,尤其是光照很可能对其起决定性作用。同时,也说明了海南野生益智居群具有较强的环境适应性,可以从中筛选出这些产量和品质的决定性性状较优的种质,或通过对这些性状进行改善,达到良种选育、品种改良的目的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:274.
- [2] 张俊清,段金殿,叶亮,等. 益智的历史沿革与应用特点[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,21(17):289-292.
- [3] 李小婷,庞玉新,杨全,等. 四大南药资源开发利用现状分析[J]. 中国现代中药,2015,17(2):99-104.
- [4] 杨福孙,李榕涛,甘炳春,等. 野生抚育益智光合特性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):123-126.
- [5] 杨福孙,甘炳春,李榕涛,等. 野生抚育益智主要性状与产量的回归模型及相关分析[J]. 中国农学通报,2010,26(2):272-276.
- [6] 庞启华. 高良姜的挥发油成分和遗传差异性分析[D]. 广州:华南理工大学,2010:78-80,82,85.

分4个浓度梯度(表2),作为正交试验各因素的水平。

2.3 ISSR 引物扩增检测 从图2可看出,由于模板DNA、引物、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA聚合酶和dNTPs 5种影响因素组合的不同,扩增效果存在明显差异。4和14号没有扩增条带,8和10号有微弱的扩增,1、2、3、7、9、11和13号有明显的扩增,1、2、3、9、11和13号泳道有弥撒现象,9、11和13号扩增多态性较1、2、3和7号好,5、6、15、16号有明显的扩增,条带清晰可辨,但亮度较暗,因此综合扩增条带的数目、强弱清晰度和可分辨率等指标比较,12号因素水平组合(模板DNA 90 ng、0.4 μ mol/L引物、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.5 mmol/L dNTPs)扩增的效果最好,条带相对较多且清晰。由表3可知,苦参ISSR-PCR体系中含因素影响从大到小依次为引物、dNTPs、 Mg^{2+} 、模板DNA、*Taq* DNA聚合酶,可见,引物影响最大,而*Taq* DNA聚合酶影响最小。最佳的ISSR-PCR反应体系为 $A_3B_3C_2D_1E_2$,即模板DNA 90 ng、0.3 μ mol/L引物、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.4 mmol/L dNTPs,与电泳图的直观分析相比,只有引物和dNTPs浓度不一样,所以正交试样12号为最佳的ISSR-PCR反应条件。根据确定的ISSR-PCR反应体系对19份苦参样品检验,结果条带多且清晰明亮,证明该体系稳定可靠,可用于苦参遗传多样性分析。

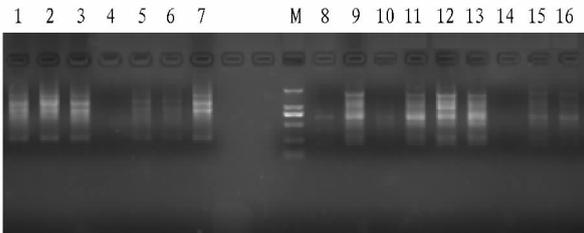


图2 正交设计ISSR-PCR反应体系扩增结果

Fig.2 Amplificated results of ISSR-PCR reaction system of orthogonal design

3 讨论与结论

苦参的化学成分主要有生物碱和黄酮类化合物,同时含有糖、酚和蛋白质等一些次生代谢物质,该试验以苦参新鲜幼嫩叶片为试验材料,用经典CTAB法对苦参进行DNA提取,结果提取的DNA质量较好,可以满足后续试验。

引物浓度会对PCR所扩增的带型产生明显的影响,浓度过低时PCR产率会大大降低,甚至不能扩增,浓度过高时

PCR所扩增的条带会变得模糊,还会产生新的位点,非特异性扩增增加; Mg^{2+} 作为ISSR-PCR反应中的一个主要因素,其浓度的变化对整个PCR反应中的*Taq* DNA聚合酶的活性、引物的退火温度以及PCR扩增条带的特异性均有一定的影响;DNA模板量也是影响ISSR-PCR扩增效果的主要因素之一,模板量过低,无扩增产物或产物少而不稳定,量过高,又会导致扩增条带的模糊和非特异性产物的出现;酶的用量在PCR反应中也是一个重要的影响因素,浓度过低则不能扩增,浓度太高又会产生非特异性扩增且增加成本;dNTPs是PCR扩增反应中磷酸基团的主要原料,dNTPs的浓度对PCR反应有至关重要的影响,当dNTPs浓度较高(>200 μ mol/L)时,可加快PCR的反应速度,但同时也会增加碱基的错误掺入率与试验成本,当dNTPs浓度较低(<50 μ mol/L)时,则会导致PCR的产率下降,因此,dNTPs的浓度常控制在50~200 μ mol/L为最佳^[11]。该研究通过ISSR-PCR反应体系的建立与优化,确定最适黔产苦参ISSR-PCR的反应体系为模板DNA 90 ng、0.4 μ mol/L引物、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、*Taq* DNA聚合酶 0.5 U、0.5 mmol/L dNTPs。苦参ISSR-PCR反应体系的建立填补了国内苦参ISSR分子标记的空白,为利用分子标记技术研究苦参种质资源鉴定和遗传多样性等提供理论依据。

参考文献

- [1] 蔡艳.苦参素药理作用研究进展[J].实用中医药杂志,2016,32(4):387-388.
- [2] 闫德祺,闰英男,阿力木·买买提,等.苦参活性成分的抗肿瘤作用机制研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(24):4776-4779.
- [3] 王景叶,马玉萍,恩替卡韦联合苦参素片治疗慢性乙型肝炎41例[J].陕西医学杂志,2009,38(10):1365-1367.
- [4] 段永红,渠云芳,王长彪,等.药用植物苦参SSR-PCR体系的优化与验证[J].中国农业大学学报,2014,19(5):95-100.
- [5] 李喜凤,邱天宝,张红梅,等.蒲公英遗传多样性的ISSR分析[J].中草药,2012,43(10):2025-2029.
- [6] 黄丽霞,罗静,李文超,等.不同方法从苦豆子中提取DNA的效果比较研究[J].宁夏农林科技,2009(3):8-9.
- [7] 任凤鸣,胡开治,刘燕琴,等.传统中药金钱草ISSR-PCR反应体系的正交优化研究[J].中国中药杂志,2014,39(12):2233-2238.
- [8] 阳翠,刘萍,刘姣蓉,等.苦豆子ISSR标记的遗传多样性分析[J].中草药,2013,44(10):1323-1327.
- [9] 王晓丽,张旭,王晓多.金樱子ISSR-PCR反应体系的建立与优化[J].时珍国医国药,2015,26(3):634-635.
- [10] 李鸿雁,李志勇,师文贵,等.3种生态型野生扁蓊豆种质资源ISSR与SSR遗传多样性分析[J].草业学报,2012,21(5):107-113.
- [11] 张福生,郭顺星.金钱莲ISSR反应体系的建立与优化[J].中草药,2011,42(1):137-142.
- [11] 翟红莉,刘寿柏,蔡真金,等.海南4个不同产地益智果实挥发油成分的GC-MS分析[J].广东农业科学,2015(19):83-86.
- [12] 刘晓静.益智自然种群的演化和遗传多样性评价[D].海口:海南大学,2008:44,47-48,50,53.
- [13] WANG H Y, LIU X J, WEN M F, et al. Analysis of the genetic diversity of natural populations of *Alpinia oxyphylla* Miquel using inter-simple sequence repeat markers[J]. Crop Sci, 2012, 52:1767-1775.
- [14] 邹颖.益智(姜科)遗传多样性和遗传结构的研究[D].北京:中国科学院大学,2013:32,35,42-43.
- [15] SLATKIN M. Gene flow in natural populations [J]. Annual review of ecology and systematics, 1985, 4:393-430.

(上接第108页)

- [7] 莫定鸣.不同高良姜栽培种苗期耐阴性研究[D].湛江:广东海洋大学,2014:1-2,4.
- [8] 李斌,顾万春,卢宝明.白皮松天然种群种实性状表型多样性研究[J].生物多样性,2002,10(2):252-255.
- [9] 谢春平,方彦,方炎明.乌冈栎天然居群叶表型变异[J].四川农业大学学报,2011,29(2):191-198.
- [10] CHEN F, LI H L, TAN Y F, et al. Different accumulation profiles of multiple components between pericarp and seed of *Alpinia oxyphylla* capsular fruit as determined by UFLC-MS/MS [J]. Molecules, 2014, 19: 4510-4523.