

青海五裂茶藨子叶绿体 DNA psbA-trnH 序列的遗传变异研究

马明呈,张育浩,元王涛,王 晨,徐宗才,田 丰,张得钧*

(青海大学,青海 西宁 810016)

摘 要:采集青海不同地理居群五裂茶藨子植物样品,采用改良 CTAB 法提取五裂茶藨子总 DNA。运用分子生物学技术分析青海不同地理居群五裂茶藨子的遗传多样性。结果表明:青海不同地理居群五裂茶藨子 psbA-trnH 序列可分为 11 种单倍型,存在 38 个变异位点,具有较高的遗传多样性($h=0.684\ 1$),单倍型多态性水平(h)为 $0.464\ 3\sim0.892\ 9$,核苷酸多态性水平(p)为 $0.005\ 90\sim0.023\ 33$ 。居群遗传分化系数 G_{st} 为 0.042 ,基因流值 N_m 为 $0.014\ 98$ 。

关键词:五裂茶藨子;叶绿体 DNA psbA-trnH;遗传变异

中图分类号:S663.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2015)04-0116-05

Genetic Differentiation Study of Chloroplast DNA psbA-trnH in *Ribes meyeri* from Qinghai

MA Ming-cheng, ZHANG Yu-hao, YUAN Wang-tao, WANG Chen,

XU Zong-cai, TIAN Feng, ZHANG De-jun*

(Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Samples of *Ribes meyeri* from different geographic populations were collected from different areas in Qinghai. The total DNA was extracted from the leaves by modified CTAB method. Genetic differentiation of chloroplast DNA trnL-F was analyzed by using molecular technology. The results showed that the samples researched could be divided into eleven genotypes, and 38 variable sites existed. High level genetic diversity existed ($h=0.684\ 1$), and haplotype diversity level was from $0.464\ 3$ to $0.892\ 9$; nucleotide diversity level ranged from $0.005\ 90$ to $0.023\ 33$; genetic differentiation (G_{st}) was 0.042 ; gene flow (N_m) was $0.014\ 98$.

Key words: *Ribes meyeri*; cpDNA psbA-trnH; genetic diversity

茶藨子属植物分布很广,在全世界约有 160 多个种^[1-2]。我国有 59 种,30 个变种,青海省有 11 种,1 个变种^[3]。五裂茶藨子(*Ribes meyeri*),又称麦氏茶藨,虎耳草科(Saxifragaceae)茶藨子属(*Ribes*)^[4]。其在青海主要分布在乐都、湟源、互助、大通、祁连、门源、兴海等地平均海拔 3 500 m 以下的山坡林下、溪流两岸,总资源量有 3 376 hm²^[5]。茶藨属植物属浆果资源,被称为第 3 代新型果树^[6]。此外,贾健辉^[7]等通过研究东北茶藨子(*Ribes mandshuricum*)与山药制得的复合饮料,发现其具有色泽协调、口感润滑、酸甜适口、营养丰富等特点。

茶藨子的嫩叶、芽和花用沸水冲,可代茶饮用,并且其具有明目、润肝、强心、清热、利尿、抗菌之功能^[8]。虽然野生五裂茶藨子资源丰富、利用价值高,但在青海地区其分布范围广,并且大多处于野生状态,目前还没有对茶藨子植物进行人工栽培的研究和开发。因而合理开发、引种、驯化五裂茶藨子,加快研究其繁育技术,全面综合利用其价值,不仅可为独特的高原生态景观的形成提供又一植物资源,还必将产生更大的生态效益、经济效益和社会效益。

植物叶绿体 DNA 在某些非编码区存在相对高的核苷酸置换率^[9],使其在植物种间和种内都表现

收稿日期:2014-09-30 修回日期:2015-03-25

基金项目:国家林业公益性行业科研专项“青藏高原原生五裂茶藨子繁育及藏药成分研究”(201304812)。

作者简介:马明呈,男,教授,硕士生导师,研究方向:经济林培育。E-mail:mmch23jop@163.com

* 通信作者:张得钧,男,教授,博士,研究方向:中藏药资源开发与利用。E-mail:djzhang@nwpb.ac.cn

出较高的遗传变异^[10]。故而,近些年来,叶绿体 DNA 在植物遗传结构评价和居群遗传多样性研究等领域得到广泛应用。本课题组应用筛选的通用引物 psbA-trnH 对青海不同地理居群五裂茶藨子的叶绿体 DNA psbA-trnH 序列进行研究,深入评价五裂茶藨子居群的居群遗传结构和遗传多样性,为青海该植物的科学分类提供一定的分子基础,为筛选优良的五裂茶藨子种质资源以及其优质资源的规范化种植开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

按照五裂茶藨子植物的分布范围,在保证采集地点不重复、每一居群样品采集个体间保持足够远的距离,同时保证所选的每个样品植株具有良好的园艺性状,以利于后期的引种栽培,随机从每一个居群随机选取 8~12 个样品(表 1),采集其幼嫩叶片并快速放入变色硅胶中干燥、备用。

表 1 五裂茶藨子采样信息

Table 1 The sample information of *R. meyeri*

居群编号	采集个体数	采集地
ZDJW1	9	青海乐都上北山林场
ZDJW2	8	青海互助黑龙沟
ZDJW3	11	青海互助浪士当
ZDJW4	8	青海大通宝库

1.2 DNA 提取与质量检测

DNA 的提取是进行后续试验的基础,高质量、高浓度的总基因组提取物是后续实验的保障。本试验采用改进的 CTBA 法提取总 DNA^[11-12]。吸取提取的基因组 DNA 4 μ L,加入 2 μ L 的溴酚蓝指示剂,配制浓度为 1% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭);在 DYY25 型双稳电泳仪下,使用 110 V 左右的恒定电压电泳 30 min;其电泳缓冲液是 pH8.0 的 1 \times TAE 溶液;电泳结束后于 Bio-RAD 凝胶成像系统上观察并拍照,以检测提取结果。

1.3 引物筛选

在试验前期阶段曾选择 cpDNA psbA-trnH、cpDNA trnS-G、cpDNA rpl20-rps12 引物进行扩增,结果显示青海不同地理居群的野生五裂茶藨子 cpDNA trnS-G 序列的差异不明显,不能有效地将青海不同地理居群的野生五裂茶藨子分开。而 cpDNA rpl20-rps12 序列扩增体系不稳定,增加了试验的难度,同时也增加了成本,也不适用于青海不同地理居群的野生五裂茶藨子。经对比,最终选择对青海不同地理居群的野生五裂茶藨子特异性较强的 cpDNA psbA-trnH 序列。

1.4 PCR 扩增和测序

根据张得钧^[13]等关于青海栽培黄管秦艽的叶绿体 DNA psbA-trnH 核苷酸变异和遗传分析文献筛选采用通用引物“psbA”和“trnH”扩增叶绿体 DNA psbA-trnH 序列;反应在实验室用 PCR 扩增仪上进行。PCR 反应总体系为 25 μ L,共包含 2.5 μ L 10 \times PCR buffer,0.2 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP(含 Mg²⁺),正反引物各 1 μ L,0.2 μ L(5U) Taq DNA 聚合酶,0.5 μ L DNA 模板和 19.6 μ L 三蒸水。该反应 PCR 扩增的程序为:94 $^{\circ}$ C,4 min;94 $^{\circ}$ C,50 s;58 $^{\circ}$ C,50 s;72 $^{\circ}$ C,50 s;共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C,7 min;得到的 PCR 产物先用 1% 的琼脂凝胶进行电泳,然后用紫外凝胶成像系统进行成像拍照,观察结果。最终挑选成像效果较好的 PCR 扩增产物送北京三博远志生物技术有限责任公司进行双向测序。

1.5 数据处理

所测得的 DNA 序列先应用 CLUSTALX 软件进行对位、校正。完成后使用 MEGA 软件^[14]计算其(G+C)含量。同时,使用 DnaSP 5.0 软件^[15]统计其相应的变异位点和单倍型,并计算其相关生物遗传学数值。最后,应用 TCS 1.2 软件^[16]构建 cpDNA psbA-trnH 片段的单倍型网络图。同时,应用 PAUP* 4.0 b10^[17]对 cpDNA psbA-trnH 片段的单倍型做最大简约性分析,检验构建的单倍型网络图。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

由图 1 可以看出,所提取的 DNA 较为完整,说明 CTAB 法用于提取五裂茶藨子基因组 DNA 是合适的,提取的 DNA 用于后续的 PCR 扩增。

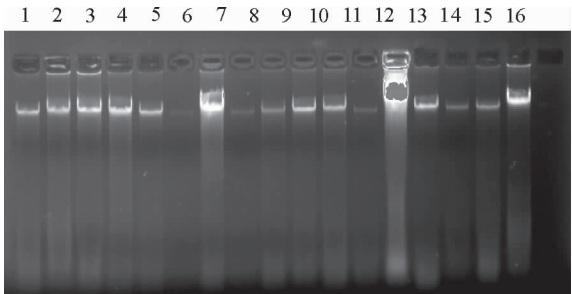


图 1 五裂茶藨子总 DNA 部分样品提取结果

Fig. 1 DNA extraction results of parts of *R. meyeri*

2.2 PCR 扩增结果

以提取的五裂茶藨子总 DNA 为模板,用通用引物 psbA-trnH 进行 PCR 扩增,通过电泳检测表明,扩增得到的 PCR 产物特异性高,目标片段长度

在 400 bp 左右(图 2)。

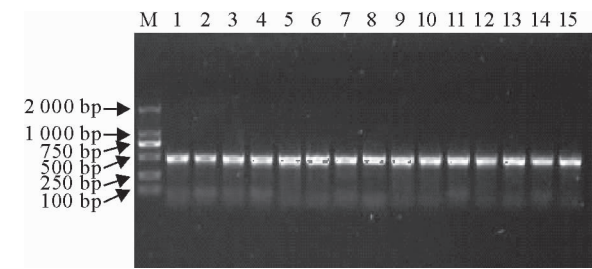


图 2 五裂茶藨子 DNA 扩增结果

Fig. 2 DNA amplification results of *R. meyeri*

2.3 序列变异分析

首先,对青海不同地理居群五裂茶藨子 36 个样品的叶绿体 DNA psbA-trnH 非编码区片段进行测试,通过序列比对发现序列长度介于 377~400 bp

之间,且其中碱基频率出现明显偏差,T 含量最高,(A+T)含量为 72.1%,明显高于其(C+G)含量。通过试验共检测到 11 种单倍型,进行序列比对后共发现有 38 个变异位点(表 2),包括 23 处插入/缺失和 15 处碱基替换。其中 23 处插入/缺失分别是 6、25、30、69、70、71、72、73、74、81、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、382 bp 位点处的单碱基插入/缺失;15 处替换:23 bp(C-T)、128 bp(A-T)、158 bp(G-T)、278 bp(A-C)、280 bp(C-G)、340 bp(G-T),各有 1 个碱基替换;7 bp(A-T)、149 bp(A-G)、194 bp(G-A)、281 bp(A-C)、305 bp(A-C)、342 bp(G-T)、358 bp(A-T)、176 bp(G-T),各有 2 个碱基替换;16 bp(C-T)处有 3 个碱基替换。

表 2 单倍型序列的变异位点

Table 2 Variable sites within the aligned sequences

单倍型	变异位点/bp																																	总数						
	6	7	1	2	2	3	6	7	7	7	7	7	8	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3		3	3	3	3		
	6	7	6	3	5	0	9	0	1	2	3	4	1	2	4	5	8	6	4	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	8	0		1	5	0	2	8	2
H ₁	—	T	C	C	—	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	2
H ₂	—	T	C	C	T	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	2
H ₃	—	T	T	C	T	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	2
H ₄	—	T	T	C	—	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	1
H ₅	—	A	T	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	1
H ₆	—	A	C	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	1
H ₇	A	T	C	C	T	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	G	20
H ₈	A	T	C	T	T	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	—	1
H ₉	A	T	C	C	T	T	—	—	—	—	—	—	T	A	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	T	G	A	—	1
H ₁₀	A	T	C	C	T	T	A	A	T	T	T	C	T	A	A	T	T	G	T	A	A	A	A	A	A	A	—	—	—	—	A	C	C	C	G	T	T	G	4	
H ₁₁	A	T	C	C	T	T	A	A	T	T	T	C	T	T	A	G	T	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	G	C	C	T	T	T	G	1	

注:“—”表示碱基缺失。

2.4 遗传分化分析

利用 TCS1.2 软件构建了 cpDNA psbA-trnH 的单倍型网络图,并用 PAUP 4.0b10 软件构建了单倍型的亲缘关系图(图 3)。

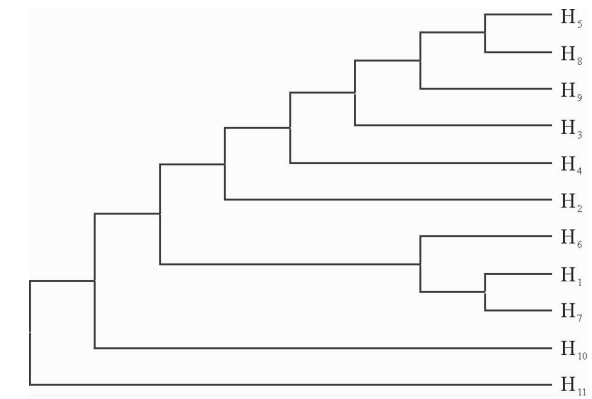


图 3 单倍型网络和亲缘关系

Fig. 3 Network of haplotype and relationship

图 3 可以看出,位于分支外部的古老单倍型 H₁₁ 仅分布在 ZDJW2 居群中,为分布范围最窄、出现频率较低的单倍型。单倍型 H₇ 分布范围最广,出现频率最高。

遗传多样性的分析结果(表 3)表明,总的种群遗传多样性为 0.684 1,青海不同地理居群五裂茶藨子中 ZDJW4 的单倍型多态性最高,为 0.464 3;而 ZDJW4 的核苷酸多态性最低,为 0.023 33。居群遗传分化系数 G_{st} 为 0.042,基因流 N_m 的值为 0.014 98,表明总遗传变异中,存在于居群内的系数为 95.8%; $N_m < 1$,表明青海不同地理居群五裂茶藨子间交流较少,居群间的遗传分化较大。

3 结论与讨论

J. Petit^[18]等通过分析不同植物居群的遗传多样性发现,植物平均 cpDNA 遗传多样性为 0.67。

表 3 单倍型分布和遗传多样性指数

Table 3 Distribution of haplotype and indexes of genetic diversity

居群编号	单倍型在不同居群中的分布														
	<i>n</i>	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈	H ₉	H ₁₀	H ₁₁	<i>H</i>	<i>h</i>	<i>p</i>
ZDJW1	9	0	0	0	0	0	1	5	1	0	2	0	4	0.694 4	0.023 33
ZDJW2	8	0	0	0	0	0	0	6	0	1	0	1	3	0.464 3	0.017 50
ZDJW3	11	0	2	0	0	0	0	7	0	0	2	0	3	0.581 8	0.017 18
ZDJW4	8	2	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	5	0.892 9	0.005 90
总和														0.684 1	0.007 57

注:*n*:序列数;*H*:单倍型数;*h*:单倍型多态性;*p*:核苷酸多态性。

本课题组通过对青海不同地理居群五裂茶藨子 36 个个体的 psbA-trnH 序列分析,发现青海不同地理居群五裂茶藨的单倍型多态性水平为 0.684 1,高于植物平均水平。有研究表明,栽培白术的遗传多样性高于人参、黄芩、地黄等草本药材,并且在国内草本药材中处于较高的水平^[19]。同时, S. Wright^[20]认为,如果群体间的基因流(N_m)<1,那么有限的基因流便是促使群体发生遗传分化的主要原因;当基因流(N_m)>1 时基因流是居群间遗传结构分化的主要原因。该研究发现青海不同地理居群五裂茶藨子的基因流 N_m (0.057 72)<1,基因交流程度较低,因而,居群之间的遗传变异较大。这可能由青海不同地理居群五裂茶藨子的繁育系统决定的,青海不同地理居群五裂茶藨子为落叶,稀常绿或半常绿灌木,生长于平均海拔 3 500 m 以下的山坡林下、溪流两岸。

通过对青海不同地理居群五裂茶藨子的 cpD-NA psbA-trnH 序列变异的研究发现,青海不同地理居群五裂茶藨子具有丰富的遗传多样性,并且其变异主要发生于居群内;同时,青海不同地理居群五裂茶藨子的遗传多样性评价可选择 cpDNA psbA-trnH 序列分析。青海不同地理居群五裂茶藨子保持较高的遗传多样性是保证茶藨子药材优良品种选育的基础,应加强保护;同时,青海不同地理居群五裂茶藨子的独特的繁育特性不利于其优质品种的保持,应进一步加深其营养繁殖的研究。建议从青海现有的野生五裂茶藨子中选育其优良种质,通过规范化种植可为市场提供更多的优质茶藨子药材,从而达到保护野生茶藨子资源的目标。

参考文献:

[1] 周志文. 黑龙江省黑穗醋栗生产科研现状及前景展望[J]. 中国林副特产品, 2009 (5):97-98.

[2] 陆玲娣. 中国茶藨子属的研究[J]. 植物分类学报, 1995, 33 (1):58-75.

LU L T. A study on the genus *Ribes* L. in China[J]. Acta Phytocaxonomica Sinica,1995, 33(1):58-75. (in Chinese)

[3] 李耀阶. 青海木本植物志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1987: 223-237.

[4] 张晶晶, 张文. 茶藨属植物研究综述[J]. 青海大学学报:自然科学版, 2013, 31(3):17-22.

ZHANG J J, ZHANG W. Research review of *Ribes* plants [J]. Journal of Qinghai University: Natural Science Edition, 2013, 31(3):17-22. (in Chinese)

[5] 杨秀玲. 浅谈青海省茶藨子植物分布现状及开发利用[J]. 青海农林科技, 2011 (4):68-70.

[6] 修荆昌, 赵伟光, 张辉. 长白山区茶藨子属资源及其开发利用[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(5):75-77.

XIU J C, ZHOU W G, ZHANG H. Studies on deveipment and utilization of libes resources in area of Changbai Mountains [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2002, 24(5):75-77. (in Chinese)

[7] 贾健辉, 张彦丽, 宋宏光. 山药东北茶藨子复合饮料的研制[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(1):36-38.

[8] 江德森, 牛佳牧, 肖艳. 吉林省长白山林区天然绿色食品资源产业化开发及模式研究[J]. 中国林副特产, 2004 (1):5-9.

[9] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17:1105-1109.

[10] NEWTON AC, ALLNOT TR, GILLIESA CM, *et al.* Molecular phylogeography, intraspecific variation and conservation of tree species [J]. Trendsin Ecology and Evolution, 1999, 14:140-145.

[11] 孙璐宏, 鲁周民, 张丽. 植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6):102-106.

SUN L H, LU Z M, ZHANG L. Advances in extraction and purification of plant genome DNA[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(6):102-106. (in Chinese)

[12] 巩艳红, 刘军, 张健, 等. 毛豹皮樟的叶片 DNA 提取及其 RAPD 引物筛选[J]. 西北林学院学报, 2004, 19 (4) :35-37.

GONG Y H, LIU J, ZHANG J, *et al.* DNA extraction and RAPD primer screening in leaves of *Litsea coreana* var. *lanuginosa*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19 (4) :35-37. (in Chinese)

[13] 张得钧, 高庆波, 李福安, 等. 青海栽培黄管秦艽的叶绿体 DNA psbA-trnH 核苷酸变异和遗传分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (25):15215-15217.

ZHANG D J, GAO Q B, LI F A, *et al.* Study on the chloroplast psbA-trnH nuclotide variation and genetic differentia-

