

文章编号:1671-8836(2013)01-0099-06

云南南部 5 种魔芋属植物居群遗传结构的 ISSR 分析

任盘宇¹, 潘明清^{2†}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 西双版纳 666303;

2. 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 采用 9 个 ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记对云南南部魔芋属植物 5 个物种(花魔芋, 疣柄魔芋, 攸乐魔芋, 勐海魔芋和屏边魔芋)105 份材料进行了居群遗传多样性分析. 通过 PCR 扩增, 9 个 ISSR 引物从 5 个物种 105 份样品中共获得 95 条条带, 其中多态性条带占条带总数的 100%. 每个位点平均等位基因数 2.00, 有效等位基因数 1.40, 平均 Nei's 基因多样性指数 0.255 2, Shannon's 信息多样性指数为 0.401 2. 在这 5 个魔芋属植物物种中, 花魔芋居群内遗传多样性水平相对较低. 居群水平上的 UPGMA 聚类表明这 5 个物种可被分为明显的两大组, 花魔芋为一组, 其余 4 种构成一组, 其中屏边魔芋与疣柄魔芋遗传距离最近. 个体水平上的聚类则显示, 花魔芋和疣柄魔芋的个体各自聚在一起, 其余 3 种的个体较为分散. 本研究结果还认为人工栽培利用的方式对魔芋属植物遗传多样性可能存在一定影响.

关 键 词: 魔芋属; ISSR; 遗传多样性; 云南省

中图分类号: Q 979.7 文献标识码: A

Population Genetic Structure of Five *Amorphophallus* Species from the South of Yunnan Province by Inter-Simple Sequences (ISSR) Markers

REN Panyu¹, PAN Mingqing^{2†}

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, Yunnan, China;

2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: The genetic diversity of five *Amorphophallus* species (*A. konjac*, *A. dubius*, *A. yuloensis*, *A. kachinensis*, *A. pingbianensis*) from the south of Yunnan province were studied with inter-simple sequence (ISSR) markers. A total of 105 individuals were included in this study. By using nine ISSR primers, a total of 95 fragments were amplified, of which 95 were polymorphic. The observed number of alleles (N_A) was 2.00, and the effective number of alleles was 1.40, the Nei's gene diversity was 0.255 2, and the Shannon's information index was 0.401 2. Among the five studied species, the lowest genetic diversity was found in *A. konjac*. The UPGMA cluster of the five species showed that five *Amorphophallus* species could be divided into two groups. The first group included the *A. konjac*, and the another group included *A. dubius*, *A. yuloensis*, *A. kachinensis* and *A. pingbianensis*. The genetic distance between *A. pingbianensis* and *A. dubius* was the smallest. At the individual level, cluster analysis demonstrated that the individuals of *A. konjac* and *A. dubius* were clustered into their corresponding species, and the rest of individuals did not cluster into their corresponding species. This results also suggested that the artificial cultivation might have an important role in reducing the genetic diversity of *Amorphophallus* species.

Key words: *Amorphophallus*; ISSR; genetic diversity; Yunan Province

收稿日期: 2012-09-24 † 通信联系人 E-mail: pmq_wuhu@yahoo.com.cn

基金项目: 神农架地区本底资源综合调查项目资助(20125nj004)

作者简介: 任盘宇, 男, 高级工程师, 现从事植物系统学研究. E-mail: rpy@xtbg.org.cn

0 引言

魔芋属(*Amorphophallus*)隶属于单子叶植物天南星科,是多年生草本植物.该属植物分布的西界为西非,波利尼西亚一线;南至印度尼西亚,加里曼丹一带;北至北纬 35°的中国陕西,甘肃一带;东界直至日本,菲律宾,新几内亚一线.在魔芋属植物的 163 个物种中共有 21 种分布于中国,其中 9 种为特有种^[1,2].由于该属植物是迄今发现的惟一能够大量合成广泛运用于医药及工业等领域的葡甘露聚糖(glucomannan)的作物,因此近年来对于魔芋属植物的研究已经成为广受关注的热点.在魔芋属植物中,花魔芋因其高产量与高葡甘露聚糖含量成为中国种植最为广泛的魔芋种类;疣柄魔芋则是印度种植最为广泛的魔芋种类,主要用于动物饲料,在中国有分布但无种植;攸乐魔芋和勐海魔芋均为可食用魔芋种类,但均无栽培记录;屏边魔芋目前未被收入《中国植物志》.

近 10 年分子标记及测序等手段已被引入到魔芋属植物种质资源的鉴定工作中,如:张玉进等^[3]对中国的 22 份魔芋资源材料进行 RAPD(polymerase chain reaction)分析,将材料分为 6 类,并构建了亲缘关系;Grob 等^[4]利用 FLO/LFY (FLORICAULA/LEAFY)第二个内含子序列对 46 种魔芋属植物资源进行了亲缘关系分析,并构建了系统进化树;滕彩珠等^[5,6]利用 AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术与 ISSR(inter-simple sequencerepeat)技术对魔芋属植物种质资源进行

多态性分析;张盛林等^[7]应用 RAPD 分子标记技术对 34 份白魔芋种质资源进行了分析;宣慢^[8]采用 ISSR 分子标记技术对 49 份魔芋属种质资源进行了遗传多样性分析.这些研究为认识魔芋属植物的分类及种质资源的遗传多样性水平提供了资料.已有研究利用细胞学特征,植物生活习性 & 染色体特征等方面的研究结果论证了魔芋属可能起源于中国云南部与中南半岛地区^[9],因此,研究中国云南部地区魔芋属植物遗传多样性及其遗传结构对于全面理解该属植物的系统发育及资源可持续利用具有重要意义.

本研究利用 ISSR 分子标记,对云南地区野生魔芋属植物 5 个物种进行遗传多样性分析,检测这 5 个不同种之间的遗传多样性差异,同时研究了人工栽培对魔芋属植物资源遗传多样性的影响,探讨了这 5 种魔芋属植物种间关系,并对未载入《中国植物志》的物种——屏边魔芋进行系统学地位初步评估,确定其近缘种.

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用材料来自于云南南部地区,包括 5 个物种(花魔芋,疣柄魔芋,攸乐魔芋,勐海魔芋,屏边魔芋)105 个植株的样本.每个物种的样本取自一个居群,每一居群分别取 6~32 份个体(表 1).对每一个体,取约 5 g 新鲜幼嫩的叶片用硅胶快速干燥保存,带回实验室用于提取基因组 DNA.

表 1 所研究物种的分布及本研究所取材料的来源

编号	中文名	拉丁名	样本数	地域	采样地点	经纬度
1	花魔芋	<i>A. konjac</i>	9	中国,日本,印度尼西亚,菲律宾	云南省普洱市菜阳河	101°11'24"E, 22°34'10"N
2	疣柄魔芋	<i>A. dubius</i>	27	云南,柬埔寨,越南,印度	云南省勐腊县勐仑镇沟谷林	101°16'15"E, 21°55'15"N
3	攸乐魔芋	<i>A. yuloensis</i>	32	云南南部	云南省勐腊县勐仑镇绿石林	101°21'13"E, 21°52'11"N
4	勐海魔芋	<i>A. kachinensis</i>	6	云南,缅甸,泰国,老挝	云南省普洱市菜阳河	101°05'38"E, 22°35'58"N
5	屏边魔芋	<i>A. pingbianensis</i>	31	云南西南部	云南省红河州河口县木龙水库	103°57'04"E, 22°34'18"N

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取参照 CTAB 法^[10].

实验所选引物从 UBC(英国哥伦比亚大学)提供的引物序列中筛选得到,共选取 9 个引物(由北京鼎盛昌盛生物技术有限责任公司合成):811,823,834,861,862,866,873,8809,889,其序列见表 2.

PCR 扩增反应在 LiftPro PCR 仪(杭州博日科技有限公司)上进行,反应总体积为 25 μ L,其中 DNA 模板 10 ng,10 $\times$ buffer 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP(脱氧核糖核苷三磷酸)2.5 μ L,1.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,TagDNA 聚合酶(5U/ μ L)0.2 μ L,引物(10 pmol/L)1 μ L,加蒸馏水至 25 μ L. PCR 扩增

表 2 本研究所用的 ISSR 引物名称及其序列

名称	序列(3'-5')
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
UBC861	ACCACCACCACCACC
UBC862	AGCAGCAGCAGCAGC
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTC
UBC873	GACAGACAGACAGACA
UBC8809	GGAGAGGAGAGGAGA
UBC889	DBDACACACACACAC

反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;然后进入扩增循环,94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,共 40 个循环;最后在 72 ℃ 延伸 10 min,于 4 ℃ 保存.电泳缓冲液为 1×TAE(Tris-乙酸),90 V 电压下电泳 1h.电泳结束后在紫外灯下观察照相,统计结果.

1.3 数据处理

记录各材料各引物扩增结果:有带记为“1”,无带记为“0”,作 0,1 矩阵图输入计算机,利用 POP-GEN32 软件计算:实际等位基因数 N_a ;平均有效等位基因数 N_e ;Nei's (1973) 基因多样性指数 H ;Shannon's 信息多样性指数 I . 并采用 NTSYS-pc (Version2.1) 软件应用平均距离法(UPGMA)对材料在居群水平上与个体水平上分别进行了聚类分析,建立聚类图.

2 结 果

2.1 ISSR 扩增结果

利用 9 个 ISSR 引物共获得 95 条清晰的可重复条带,其中多态性条带 95 条,占总条带数的 100%. 图 1 为引物 UBC811 对花魔芋与部分疣柄魔芋样本的扩增效果.

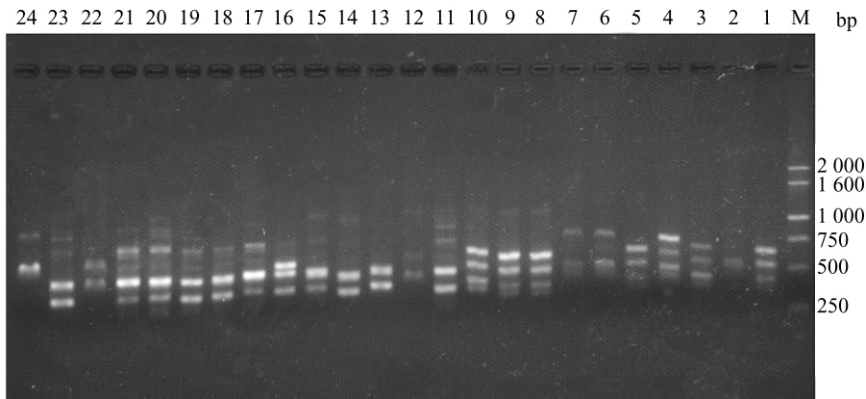


图 1 引物 UBC811 对花魔芋与部分疣柄魔芋样本的扩增效果
1~9 为花魔芋;10~24 为疣柄魔芋

2.2 遗传多样性指标

各居群内遗传多样性相关数据见表 3. 5 种魔芋的多样性水平从高到低依次为屏边魔芋,攸乐魔芋,疣柄魔芋,勐海魔芋,花魔芋. 其中屏边魔芋拥有最高的遗传多样性水平($H=0.2526$, $I=0.3940$);而花魔芋遗传多样性水平最低($H=0.1340$, $I=0.2038$). 对 105 份样本数据进行统计分析,其中, $N_a=2.00$, $N_e=1.40$.

2.3 居群间遗传距离与遗传相似度

5 个魔芋属植物居群间 Nei's(1978) 遗传距离与遗传相似度见表 4. 其中,群体间相似度为 0.9666~0.8884,最大遗传相似度出现在攸乐魔芋与疣柄魔芋之间,其相似度为 0.9666;遗传距离为 0.1924~0.0574 最大遗传距离出现在攸乐魔芋与勐海魔芋之间,其距离为 0.1924.

表 3 5 种魔芋各居群的遗传多样性指标

魔芋	样本数	多态性条带	多态性条带比例/%	N_a	N_e	H	I
<i>A. konjac</i>	9	39	41.05	1.41	1.22	0.1340	0.2038
<i>A. dubius</i>	27	74	77.89	1.78	1.36	0.2259	0.3514
<i>A. yuloensis</i>	32	75	78.95	1.79	1.42	0.2470	0.3750
<i>A. kachinensis</i>	6	51	53.68	1.54	1.27	0.1696	0.2617
<i>A. pingbianensis</i>	31	84	88.42	1.88	1.41	0.2526	0.3940

表 4 魔芋属植物居群间 Nei's(1978)遗传距离与遗传相似度

魔芋	<i>A. konjac</i>	<i>A. dubius</i>	<i>A. yuloensis</i>	<i>A. kachinensis</i>	<i>A. pingbianensis</i>
<i>A. konjac</i>	—	0.930 7	0.924 3	0.888 4	0.890 4
<i>A. dubius</i>	0.071 8	—	0.966 6	0.943 1	0.955 2
<i>A. yuloensis</i>	0.078 8	0.034 0	—	0.931 1	0.944 2
<i>A. kachinensis</i>	0.118 3	0.058 6	0.192 4	—	0.943 5
<i>A. pingbianensis</i>	0.116 1	0.045 8	0.057 4	0.058 2	—

上部分数据为 Nei's 遗传相似度;下部分数据为 Nei's 遗传距离

2.4 居群水平的聚类分析

根据扩增结果利用 Nei's(1978)遗传距离进行聚类分析,5 个群体被分为两组,其中花魔芋自成一组,疣柄魔芋,攸乐魔芋,勐海魔芋与屏边魔芋组成一组.5 个物种的魔芋资源聚类图见图 2.

2.5 个体水平上的聚类分析

对 105 份材料的 MP(maximum parsimony)聚

类图见图 3.

分析结果表明:样品间 Jaccard 相似性系数为 0.857 1~0.054 6,样品间 SM 相似性系数为 0.947 4~0.473 7;其中花魔芋样品之间较好地聚类到一起;疣柄魔芋样品之间也较好地聚类到一起,而其他 3 个物种的个体在聚类图(见图 3)上的分布则较为分散.

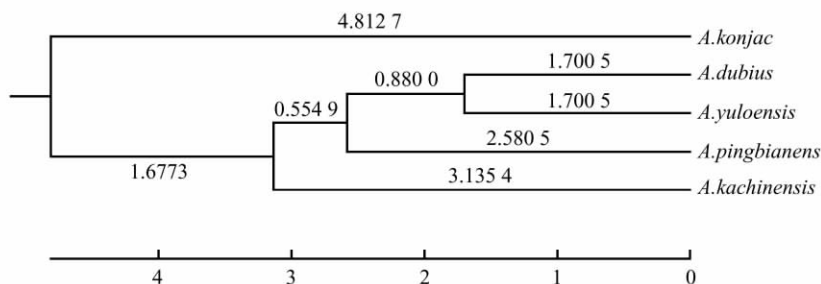


图 2 5 个物种的魔芋资源聚类图
聚类树上显示的数值为各枝枝长

3 讨 论

总体而言,不同种类的魔芋属样品间均表现出较高的遗传相似度差异.本研究根据对全部 105 份样本的数据进行计算得到样品间 Jaccard 相似性系数为 0.857 1~0.054 6,样品间 SM 相似性系数(simple matching coefficient)为 0.947 4~0.473 7,遗传多样性高于此前的研究结果.滕彩珠等^[6]利用 ISSR 技术对魔芋属植物种质资源进行多态性分析,30 份的样本中(包括 6 份野生资源及 24 份栽培材料:花魔芋 16 份,白魔芋 5 份,东盟魔芋 1 份,甜魔芋 1 份,珠芽魔芋 1 份)Jaccard 相似性系数为 0.95~0.65.宣慢^[8]采用 ISSR 技术对 49 份魔芋属资源的多样性分析,其 SM 相似性系数为 1.00~0.68.

出现较高遗传相似度的原因可能有:

① 此前研究中采用的多为栽培材料,而一般栽培材料多采用无性繁殖方式繁殖,这可能导致较高遗传相似度;而本实验采用野生材料,在自然环境下

无性繁殖的同时兼有异花授粉方式的有性繁殖;

② 本研究中的分析对象既包括经济价值的葡甘露聚糖利用型魔芋种(花魔芋)和淀粉利用型魔芋种(疣柄魔芋),又包括非经济利用型的魔芋种,选材更为宽泛;

③ 研究材料来源于被认为是天南星科植物起源中心的云南地区.

对 5 个物种的居群遗传多样性平行比较发现,花魔芋具有最低的遗传多样性.与其他魔芋属植物比较,花魔芋作为葡甘露聚糖利用型魔芋在中国得到大规模种植与利用,人工种植与对野生资源的采挖可能导致了花魔芋野生居群具有较低水平的遗传多样性.作为目前利用最为广泛的魔芋种,资源多样性保护直接关系到该物种的开发潜力与利用价值.因此,进一步评估花魔芋遗传多样性水平,提出该物种可行的保护策略迫在眉睫.

种间聚类分析发现其中花魔芋自成一组,疣柄魔芋,攸乐魔芋,勐海魔芋与屏边魔芋构成一组.另外,屏边魔芋与疣柄魔芋,攸乐魔芋,勐海魔芋具有

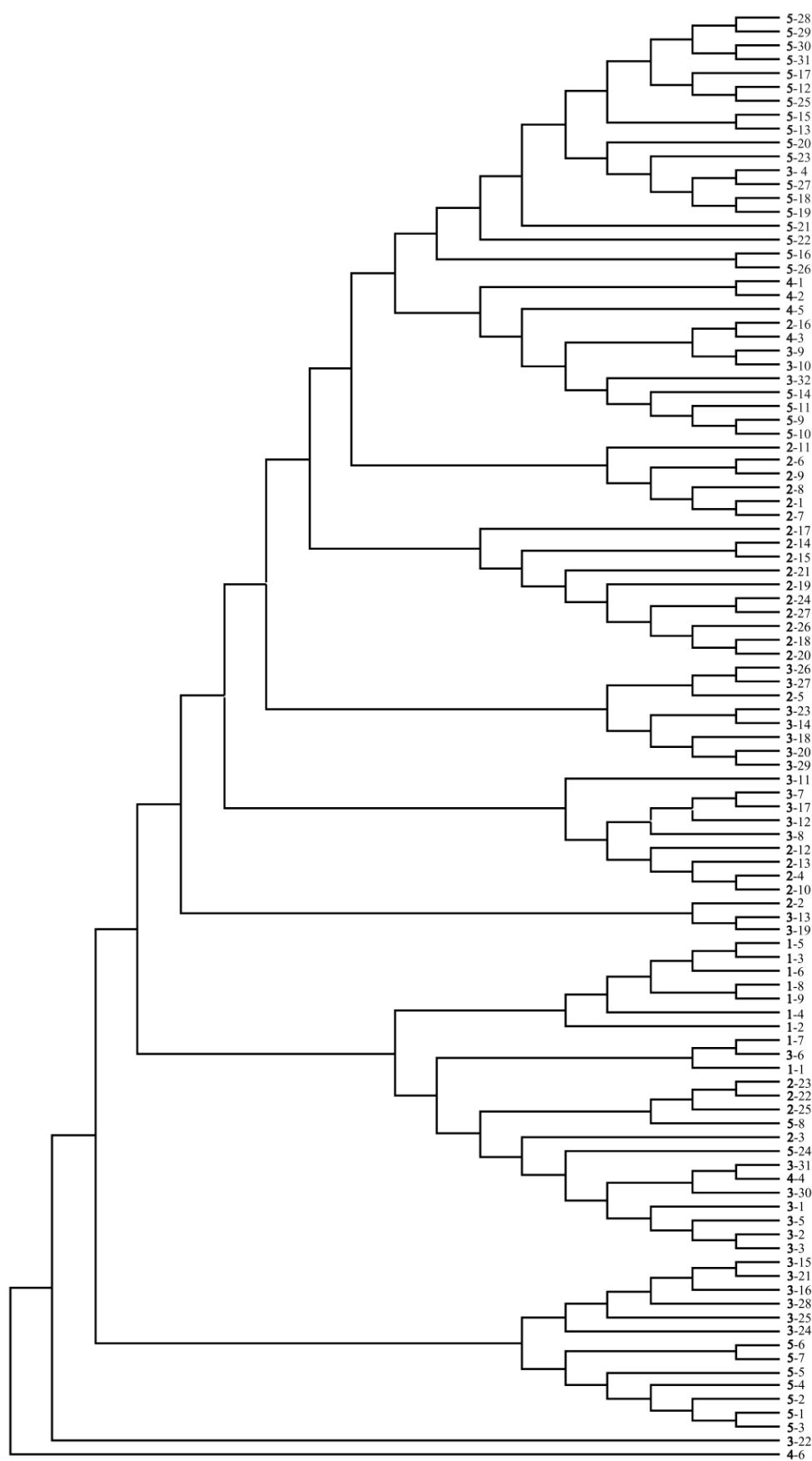


图 3 105 份魔芋属植物 MP 聚类图

图中样本 1~5 分别对应花魔芋(9 份)、疣柄魔芋(27 份)、攸乐魔芋(32 份)、勐海魔芋(6 份)、屏边魔芋(31 份)

较高相似度,其中与疣柄魔芋相似度最高(Nei's (1978)遗传相似性为 0.955 2)。该结果说明屏边魔芋遗传学上可能与疣柄魔芋较近,可能偏向于淀粉利用型。除花魔芋和疣柄魔芋样品间分别较好地聚在一起,其他 3 个物种的样品则较为离散。虽然基于 ISSR 分子标记的研究尚不足以对魔芋属物种划分和种间关系作出判定,但可以为魔芋属的系统学研究提供可参考的资料。

参考文献:

- [1] 李恒,龙春林. 中国魔芋属的分类问题[J]. 云南植物研究,1998,20(2):167-170.
Li Heng,Long Chunlin. Taxonomy of *Amorphophallus* in China[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1998, 20(2):167-170(Ch).
- [2] 李恒. 从生态地理探索天南星科的起源[J]. 云南植物研究,1996,18(1):14-42.
Li Heng. The Ecological Phytogeography and arigin of the family araceae [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1996, 18(1):14-42(Ch).
- [3] 张玉进,张兴国,刘佩英,等. 魔芋种质资源的 RAPD 分析[J]. 西南农业大学学报,2001,23(5):418-421.
Zhang Yujin,Zhang Xingguo,Liu Peiying,*et al.* RAPD Analysis of *Amorphophallus* Germplasms[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, 23(5): 418-421(Ch).
- [4] Grob G B J, Gravendeel B, Eurlings M C M. Potential phylogenetic utility of the nuclear FLORICAULA/LEAFY second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in *Amorphophallus* (Araceae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30: 13-23.
- [5] 滕彩珠,刁英,易继碧,等. 魔芋种质资源的 AFLP 分析[J]. 氨基酸和生物资源,2006,28(4):33-35.
Teng Caizhu,Diao ying,Yi Jibi,*et al.* AFLP Analysis of Relative Relationships Among Germplasm Resources of *Amorphophallus*[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*,2006,28(4):33-35(Ch).
- [6] 滕彩珠,刁英,常福浩森,等. 云南魔芋种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 安徽农学通报,2006,12(11):54-56.
Teng Caizhu,Diao Ying,Chang Fuhaosen,*et al.* ISSR Analyses of Relative Relationships among Germplasm Resources of *Amorphophallus Blume* from Yunnan Province[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2006, 12(11):54-56(Ch).
- [7] 张盛林,孙远航. 白魔芋种质资源的 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2006,22(12):401-402.
Zhang Shenlin,Sun Yuanhan. RAPD analysis of the *Amorphophallus albus* germplasm[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006,22(12):401-402(Ch).
- [8] 宣慢. 魔芋种质资源形态多样性与 ISSR 分析[D]. 重庆:西南大学,2010.
Xuan Man. *Diversity of Morphology and ISSR Analysis of Amorphophallus Germplasms* [D]. Chongqing:Southwest China University,2010(Ch).
- [9] 刘佩瑛. 魔芋学. [M]. 北京:中国农业出版社,2004.
Liu Peiying. *Konjac* [M]. Beijing:Chinese Agriculture Press,2004(Ch).
- [10] 杨朝柱,潘娅妮,谢玲玲,等. 魔芋 DNA 快速微量提取及其 ISSR-PCR 扩增[J]. 基因组学与应用生物学, 2009,28(3):529-534.
Yang Chaozhu,Pan yani,Xie Lingling,*et al.* A Rapid DNA miniprepation for *Amorphophallus Blume* and suitable for ISSR-PCR[J]. *Genomics and Applied Biology*,2009,28(3):529-534(Ch).

□