

我国特有濒危药用植物 降香黄檀遗传多样性研究^{*}

杨新全 冯锦东^{**} 魏建和 李榕涛 何明军

(中国医学科学院 药用植物研究所海南分所 海南 571533)
(中国协和医科大学)

杨成民 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100094)
(中国协和医科大学)

摘要:应用 RAPD 标记对降香黄檀的遗传多样性进行研究,从 144 个 10-mer 随机引物中筛选出 6 个具有多态性检测能力的引物。对 6 个居群的 77 份降香黄檀样品进行了分析,共检测出 33 个位点,多态位点 18 条,占 54.55%。物种水平 Nei 基因多样性指数 (h) 为 0.2137, Shannon 信息指数 (I) 为 0.3137, 以上三个指标在居群水平的平均值依次为: 40.9%、0.1353、0.2048。结果表明降香黄檀遗传多样性较丰富,认为其资源濒危主要源于乱砍滥伐,并提出保护策略。

关键词:降香黄檀 遗传多样性 RAPD

降香黄檀 (*Dalbergia odorifera* T. Chen) 以树干、根的干燥心材入药,具行气活血、止痢、止血功效^[1],为国家药典收载名贵南药之一,现代研究发现降香黄檀具有抗氧化^[2]、抑制中枢^[3]等作用。降香黄檀心材极耐腐,切面光,且香气经久不灭,用于高档家具、工艺品等。野生降香黄檀主要分布于我国海南省的中部和南部,一般成片生长,形成以降香黄檀为上层树种的植物群落类型^[4]。由于降香黄檀具有极高药用和工艺品等价值,野生资源已遭毁灭性的破坏,濒于灭绝,被

列为国家二级重点保护野生植物^[5]。

目前对降香黄檀质量^{[6][7]}、有效成分提取分析^{[8][9]}、药理药效^{[2][3]}等方面研究较多,但在遗传多样性保护、分子生物学等方面研究基本没有开展。降香黄檀居群遗传多样性水平如何,是否会由于遗传背景狭窄而加速濒危步伐,为了回答这些问题,本研究首次利用 RAPD 分子标记技术对降香黄檀六个居群基因组进行了随机扩增多态性分析。

一、材料与amp;方法

1. 植物材料

供试材料于 2006 年 6 月采自海南 5 个地区的 6

收稿日期: 2006-10-20

修回日期: 2007-03-28

* 科技部“十五”科技攻关计划项目(2004BA721A30):道地药材益智与濒危药材隆香种质资源及其评价研究,负责人:冯锦东。

** 冯锦东,副研究员,主要从事南药资源保护及栽培研究, Tel: 0898 - 62552046, E-mail: feng_jindong@163.com。

个居群(图 1),每个居群中随机选择单株采样,每单株作为一个样品,共采集 77个样品,见表 1。

2 试剂

RAPD引物和 dNTP购自上海生工生物工程技术有限公司, Taq DNA Polymerase购自上海申能博彩科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

3. DNA提取

取 0.2g样品和 0.1g PVP-40于液氮中研磨,加入 1mL 65℃ 预热的 2xCTAB 提取缓冲液(2% CTAB; 1.4mol·L⁻¹ NaCl (PH8.0); 0.02mol·L⁻¹ EDTA (PH8.0); 0.1mol·L⁻¹ Tris-HCl (PH8.0); 0.06mol·L⁻¹ Vitamin C; 4% β-巯基乙醇), 65℃ 水浴 1h, 11000r/min离心 10min,取上清,加入等体积的 Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1, 11000r/min离心 10min,重复抽提一次。取上清加入等体积氯仿:异戊醇 = 24:1 重复抽提一次,抽上清加入 1/10 体积的 5mol/L 的 NaCl,加入 2/3 体积的 -20℃ 预冷的异丙醇, -20℃ 条件下沉淀 30min,把 DNA 吸出,用 70%乙醇清洗 2-3 次,吹干,加入 100μL TE 缓冲液溶解,放 -20℃ 冰箱备用。

4. DNA完整性和浓度检测

取 5μL DNA 溶液上样于 1.4%琼脂糖凝胶中,将标准 Lambda DNA 稀释为 7个浓度梯度同时上样,以 100V 电压电泳 2小时停止电泳,EB 染色后成像,将样品稀释到 20μg/L 备用。

5. RAPD-PCR 程序

PCR 反应体系共 25μL 包括:模板的 DNA 20ng, Taq DNA Polymerase 2.5U, Mg²⁺ 5mmol·L⁻¹, dNTP 0.3 mmol·L⁻¹, 随机引物 0.4 μmol·L⁻¹。反应条件为 94℃ 预变性 4min; 94℃ 30s, 36℃ 1min, 72℃ 2min, 40个循环; 72℃ 延伸 10min。扩增产物以 100V 电压电泳 2小时停止电泳,EB 染色后成像。

6 多态性引物筛选

从 6个地区各取出 1份 DNA 样品对 144个随机引物进行了初步筛选,有 134个引物能够扩增出条带,其中 6个随机引物能扩增特异性条带见表 2。

7. 数据分析

根据条带的有无统计数据,有带计为“1”,无带计

表 1 降香黄檀采样地及采样数

居群代码	采样地	样品数	样品编号
WNYY	海南省万宁医药总公司南药基地	16	1-16
LDJF	海南省乐东县尖峰岭	18	17-34
TCFS	海南省屯昌枫木树木园	10	35-44
TCHL	海南省屯昌枫木鹿场	4	45-48
QHIM	海南省琼海市潭门镇大洲上拥村	15	49-63
QSZT	海南省琼山遵潭镇儒和村	14	64-77

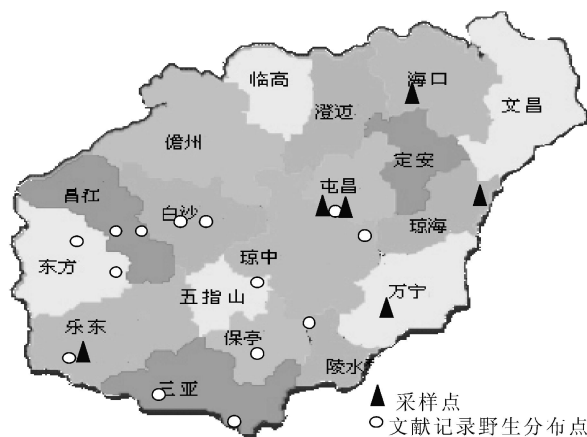


图 1 本次采样点、文献记录野生降香黄檀分布点

表 2 RAPD 扩增反应中使用的引物

引物	引物序列
S49	CTCTGGAGAC
S52	CACCGTATCC
S63	GGGGGICTTT
S334	CACCGTATCC
S343	TC'TCCGCTTG
S510	CCA'TTCCCA

为“0”。将数据用 POPGENE 软件计算各居群的多态性条带百分率、Nei 基因多样性指数 (h) 和 Shannon 信息指数 (I) 以及居群间遗传距离,根据遗传距离,对海南 6个降香黄檀居群进行 UPGMA 聚类分析。

二、结果与分析

1. 降香黄檀的遗传多样性

降香黄檀遗传多样性分析的所有样品均得到分子

量范围在 200 ~ 3000bp 的条带。6 个引物对 77 个样品共检测到 33 个位点,其中 18 个为多态位点,占 54.55%,6 个居群的多态性位点百分率在 30.30% - 51.52% 之间,平均为 40.9%;Nei 基因多样性指数在 0.1125 - 0.1672 之间,平均为 0.1353; Shannon 信息指数在 0.1694 - 0.2528 之间,平均值为 0.2048。在物种水平上,多态性位点百分率为 54.55%,Nei 基因多样性指数为 0.2137, Shannon 信息指数为 0.3137,见表 3。

2 降香黄檀的遗传结构

对降香黄檀 6 个居群 77 个样品进行遗传多样性分析结果表明,其居群的遗传距离在 0.0417 - 0.1632 之间,相似系数在 0.8123 - 0.9591 之间见表 4,UPGMA 聚类分析显示,万宁医药总公司和屯昌枫木树木园 2 个居群的遗传距离最小为 0.0417,屯昌枫木鹿场和琼海市潭门 2 个居群的遗传距离最远为 0.1632,见图 2。

表 3 降香黄檀遗传多样性

居群	多态位点 比率 %	Nei 多样性 指数 h	Shannon 指数 I
WNYY	39.39	0.1444	0.2155
LDJF	48.48	0.1672	0.2528
TCFS	30.30	0.1142	0.1694
TCHL	33.33	0.1172	0.1740
QHIM	51.52	0.1563	0.2396
QSZT	42.42	0.1125	0.1777
物种间	54.55	0.2137	0.3137

注:居群代码见表 1

表 4 降香黄檀 6 个居群的遗传距离和相似性系数

居群	WNYY	LDJF	TCFS	TCHL	QHIM	QSZT
WNYY		0.9092	0.9591	0.8747	0.9402	0.9129
LDJF	0.0951		0.9164	0.8832	0.9408	0.8555
TCFS	0.0417	0.0873		0.8828	0.9438	0.8786
TCHL	0.1339	0.1241	0.1247		0.8494	0.8123
QHIM	0.0616	0.0610	0.0579	0.1632		0.9572
QSZT	0.0911	0.1561	0.1294	0.2079	0.0437	

注:左下角数字为遗传距离,右上角为相似系数注,居群代码见表 1

三、讨论

1. 降香黄檀的遗传多样性分析

降香黄檀为黄檀属植物,异花授粉,翅果,主要靠种子繁殖,原始分布在海南省的中部和南部(图 1)。从海南岛总地形地貌来看,其分布形成同一阶梯的形式,从三亚的高峰开始,到乐东的尖峰岭,再沿着岛西走廊由东方县的广坝、大田经昌江县的七槎、坝王等地直到白沙县的南开、青松、细水等地,降香黄檀均生长在同一海拔高度的山腰或山脚。其他分布地区有陵水县的吊罗山、琼中县的白马岭、五指山等^[4]。本研究表明降香黄檀物种水平 PPB 为 54.55%,居群为 40.9%,具有较高的遗传多样性。从降香黄檀野生分布地来看,各分布区的气候、环境等有明显差异,如吊罗山和尖峰岭两大热带林区的气温及降雨差异较大,年均气温尖峰岭热带林区比吊罗山林区偏高 0.4℃,年降雨量尖峰岭林区比吊罗山林区少 500 mm 左右^[10]。海南省东部潮湿多雨,中部多山,西部干旱。本次所采降香黄檀样品种质背景复杂,各居群所处地理位置的不同而产生的水热条件差异和降香黄檀生物学特性都是遗传多样性丰富的影响因素。

2 降香黄檀濒危原因及保护措施

物种的遗传多样性水平、生活史特性以及生态学因素均会影响到物种的生存和发展,研究表明,降香黄檀表现较高的遗传多样性,且其适应环境能力强,因此导致其濒危的主要原因可能是人为破坏,乱采滥挖所致。近年来因降香黄檀用途的扩展、用量的增加,采伐量增加,野生种质流失现象严重。原有文献记载的野生分布点现已很难再找到该植物,比如,2004 年在三

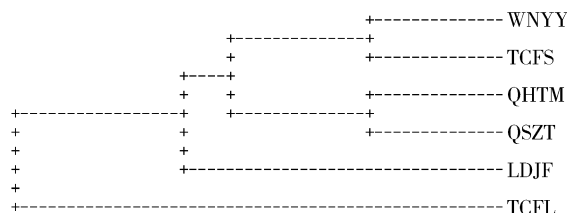


图 2 降香黄檀居群间的 Nei 遗传距离 UPGMA 聚类图

注:居群代码见表 1

亚南山附近零星分布降香黄檀小树,到 2006 年调查时,该处已无降香黄檀。目前降香黄檀只有在少数几个保护区有少量分布,以及部分植物园引种、收集保存和农民移栽所保留下来的,数量有限。

为了保护降香黄檀资源及其遗传多样性,在宣传保护的同时,要广泛地收集现有各降香黄檀种群的种质资源,并加强保护和管理措施,保持其居群中丰富的遗传多样性。对遗传性高的且面积较小的群体采取就地保护、繁殖。建议相关的职能部门加强对偷采滥伐的监管,保护每一株野生降香黄檀种质资源;同时开展对降香黄檀的种质保存及扩繁的研究,扩大其居群规模;通过高新技术的应用建立核心种质库以提高种质资源管理的质量和效率。

参考文献

1 国家药典编委会. 中华人民共和国药典. 北京:化学工业出版社,

- 2005, 1 158
- 2 姜爱莉,孙利芹. 降香抗氧化成分的提取及活性研究. 精细化工, 2004, 21 (7) 525 ~ 528
 - 3 张磊,刘干中. 降香的中枢抑制作用. 上海中医药杂志, 1987, 12 39 ~ 40.
 - 4 何明通. 海南岛降香资源的调查. 中药材, 1987, 6 20 ~ 21.
 - 5 马文辉,钟琼芯,符永登. 海南省珍稀濒危植物和重点保护野生植物. 海南师范学院学报, 2003, 16 (4) 68 ~ 71.
 - 6 刘心纯,赖小平,徐鸿华. 中药降香品种的细胞形态鉴别. 广州中医药大学学报, 1996, 13 (3, 4) 79 ~ 82
 - 7 林励,徐鸿华,肖省娥,等. 不同品种降香质量研究. 中药材, 1997, 20 (6) 366 ~ 369.
 - 8 郭济贤,田珍,楼之岑. 降香挥发油化学成分的鉴定. 药物分析杂志, 1983, 3 (1) 4.
 - 9 韩静,唐星,巴德纯. 降香挥发油的理化性质研究. 中医药学刊, 2004, 22 (7) 1292 ~ 1294.
 - 10 邱治军,邱坚锐,周光益. 海南吊罗山与尖峰岭热带林区气象要素对比研究. 生态科学, 2004, 23 (4) 338 ~ 341.

Genetic Diversity of China 's Endangered Medicinal Plant *Dalbergia odorifera*

Yang Xinquan, Feng Jindong, Wei Jianhe, Li Rongtao, He Mengjun

(Hainan Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Peking Union Medical College, Hainan 571533 China)

Yang Chengmin

(Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

In this study, RAPD markers were used to understand the genetic diversity of *D. odorifera*. 6 effective primers were selected randomly from 144 specimens, to assess 77 individuals in 6 populations. A total of 33 DNA fragments were scored, 18 of which showed polymorphism. The POPGENE based analysis produced a range of polymorphic - band percentages. Nei gene diversity (h) and Shannon information index (I) of *D. odorifera* were 54.5%, 0.2137 and 0.3137 respectively, at a species level. At the population level, 3 parameters mentioned above were averaged at 40.9%, 0.1353 and 0.2048, respectively. Relatively high level of genetic variations was identified in *D. odorifera*. The endangered status was mainly caused by human excessive exploitation of natural resources. Strategies were proposed for managing and protecting *D. odorifera* in the future.

Keywords: *Dalbergia odorifera*; genetic diversity; RAPD

(责任编辑:王 瑀, 责任编辑:张志华, 责任译审:邹春申)