

箭叶淫羊藿居群形态及遗传多样性比较研究

梁琼^{1,2}, 张燕君¹, 徐艳琴³, 黄宏文¹, 王瑛^{1*}

(1. 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 江西中医学院药学院, 南昌 330004)

摘要: 箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 是淫羊藿属中分布最广、形态变异最大、分类学最难处理的一个物种, 不同箭叶淫羊藿居群其形态、活性成分等差异较大, 质量极其不稳定。本实验选择湖北罗田等 12 个不同的箭叶淫羊藿地理居群, 在武汉植物园进行同园栽培, 分析其主要形态数量性状及遗传多样性。结果发现箭叶淫羊藿不同居群在形态上表现出各自明显的差异。基于 AFLP 数据进行的遗传多样性分析显示, 各居群聚类关系与地理分布密切相关, 柳州居群(LZ)、西南居群(CL、HH、ZY)、华东华中居群(YT、WN、NF、HS、QZ、SG、LY、LT)依次分出。而形态分层聚类分析显示各居群形态变异复杂, 只有部分与遗传多样性有一定的相关性。本研究结果对箭叶淫羊藿分类研究及资源筛选具有重要指导作用。

关键词: 箭叶淫羊藿; 地理居群; 形态变异; 遗传多样性

中图分类号: Q949.95; Q949.746.8

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)04-0422-06

Morphological Variations and Genetic Diversity of *Epimedium sagittatum* Populations

LIANG Qiong^{1,2}, ZHANG Yan-Jun¹, XU Yan-Qun³, HUANG Hong-Wen¹, WANG Ying^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: *Epimedium sagittatum* has wide distribution and the large morphological variation, which makes it difficult to classify. In addition, great differences related to morphological traits and bioactive components exist between different populations with unstable quality. In this study, quantitative morphological characters and genetic diversity of 12 geographic populations of *E. sagittatum* were determined by a common garden experiment in the Wuhan Botanical Garden, CAS. The results showed there were significant differences in morphological traits. Based on AFLP data, the genetic diversity analysis demonstrated that population relationships were closely related with geographical distribution: Liuzhou population(LZ), Northwest populations(CL, HH, ZY) and Eastern and Central China populations(YT, WN, NF, HS, QZ, SG, LY, LT) were successively separated. But complicated morphological variations were shown by hierarchical cluster analysis of the main quantitative morphological characters and only part of the populations showed a certain relationship with genetic diversity. This study provides important information on the taxonomy and exploration of quality resources of *E. sagittatum*.

Key words: *Epimedium sagittatum*; Geographic population; Morphological variation; Genetic diversity

收稿日期: 2012-12-14, 修回日期: 2013-03-11。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900076, 31100146); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-20); 中国科学院国家外国专家局“创新团队国际合作伙伴计划”。

作者简介: 梁琼(1975-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为药用植物资源筛选评价与开发利用(E-mail: qiongli@wbpcas.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yingwang@wbpcas.cn)。

淫羊藿为小檗科 (Berberidaceae) 淫羊藿属 (*Epimedium* L.) 多年生草本植物, 是重要的药用植物, 也是优良的地被观赏植物^[1]。在目前的分类系统中, 全世界已发表的淫羊藿属植物约 58 种, 我国有 48 种^[2], 我国是该属植物地理分布中心和物种多样性中心^[3,4]。淫羊藿作为滋补类中草药始载于《神农本草经》, 不仅有补肾阳、强筋骨、祛风湿等作用, 还有抗衰老、提高免疫力、抑制肿瘤等功效, 为最具开发潜力的中草药之一^[5,6]。

箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.) (又称三枝九叶草) 为《中华人民共和国药典》^[7] 收载种, 广泛分布于我国的华东、华南、华中及西南地区, 是淫羊藿属中分布最广、形态变异最大、分类学最难处理的一个物种^[6,8,9], 不同箭叶淫羊藿居群形态、活性成分等差异较大, 质量极其不稳定^[10,11]。另外, 作为华南华东地区淫羊藿的主流药材^[6], 弄清其主要居群药材质量差异的遗传基础, 筛选质量表现稳定、栽培性能好的优良居群, 是实现箭叶淫羊藿规模化生产的重要基础。同园栽培 (common garden) 是指将不同生境居群的个体或近缘类群引种栽植在同一园地, 保

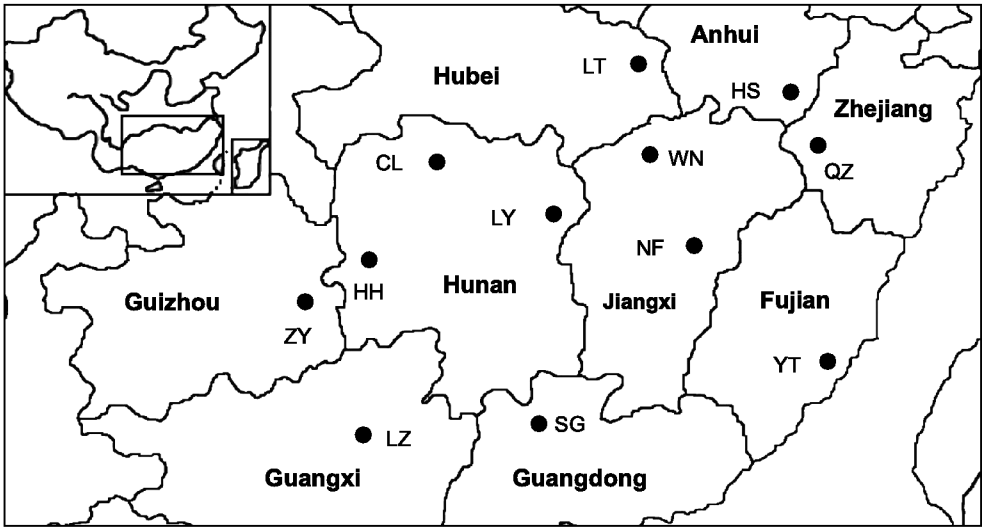
持其生境的一致性, 从而剔除表型变异中的环境因素, 达到筛选基于遗传基础的稳定优异居群。同园栽培实验广泛运用于资源评价研究^[12]。

因此, 开展箭叶淫羊藿遗传多样性及田间栽培中易于区分的形态差异分析, 对于箭叶淫羊藿优异居群筛选及规模产业化具有重要的作用。本实验选择箭叶淫羊藿 12 个地理居群, 通过同园栽培开展其形态及遗传基础分析, 为箭叶淫羊藿优异资源发掘及其规模化栽培提供科学依据, 同时, 也将为科学制定淫羊藿资源保育储备与可持续利用策略提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 居群选择

在箭叶淫羊藿 (*Epimedium sagittatum*) 分布区内选择具有地理代表性的湖北罗田 (LT)、贵州镇远 (ZY)、湖南浏阳 (LY)、湖南怀化 (HH)、湖南慈利 (CL)、安徽黄山 (HS)、广东韶关 (SG)、广西柳州 (LZ)、福建永泰 (YT)、江西武宁 (WN)、江西南丰 (NF)、浙江衢州 (QZ) 共 12 个箭叶淫羊藿居群 (图 1), 于武汉植物园进行同园栽培。



LT: 罗田居群 (Luotian population); LY: 浏阳居群 (Liuyang population); CL: 慈利居群 (Cili population); SG: 韶关居群 (Shaoguan population); YT: 永泰居群 (Yongtai population); NF: 南丰居群 (Nanfeng population); ZY: 镇远居群 (Zhenyuan population); HH: 怀化居群 (Huaihua population); HS: 黄山居群 (Huangshan population); LZ: 柳州居群 (Liuzhou population); WN: 武宁居群 (Wuning population); QZ: 衢州居群 (Quzhou population)。下同 (The same below)。

图 1 箭叶淫羊藿 12 个居群地理分布

Fig. 1 Geographic distribution of 12 populations of *Epimedium sagittatum*

1.2 形态学研究

选择两年生植株，进行三出复叶中间叶片长宽比、中间叶片重、花梗与花序轴长、小花数、株高等数量性状分析，花期随机选择 10 株测量分析（株高分析取样数为 50 个植株）。

1.3 遗传多样性分析

1.3.1 样品采集与制备

于花期采集三出复叶的中间幼嫩叶片，速冻于 -80℃低温冰箱中，冻干仪干燥 5 d。取每份样品干样 20 mg 用振荡仪将样品粉碎，用于 DNA 提取。

1.3.2 DNA 的提取和 AFLP 方法

采用 DNeasy Plant Mini Kit(德国 QIAGEN 公司)提取 DNA，利用荧光法将提取的 DNA 定量，并稀释到 50 ng/μL 的工作液备用。按照 Vos 等介绍的方法^[13]，利用 AFLPTM Analysis System 1 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) 进行 AFLP 分析。筛选出 8 对引物制备预扩增模板 DNA，将目的基因组进行双酶切，得到预扩增模板，然后用筛选出来的 8 对引物进行预扩增(表 1)。

1.3.3 统计分析

将基因型谱带分析的电泳结果按照有带记为“1”，无带记为“0”变成数据形式统计 90~650 bp 谱带。根据多态位点的基因频率，用 NTsys 软件以 Nei's 遗传距离做 UPGMA 聚类分析。

2 结果

2.1 形态学研究

2.1.1 叶片长宽比

叶片长宽比(表 2)反映了居群叶片的形状，分

别测量各居群植株同侧第一个分支三出复叶的顶叶叶长(叶基到叶尖的距离)、叶宽(叶片最宽处的距离，cm)，计算平均长宽比。经 Spss16.0 软件方差分析，结果表明不同居群叶片长宽比存在显著差异，黄山居群叶片最细长，长宽比达 2.469，慈利及永泰居群分别为 2.361、2.356，罗田居群叶片长宽比最小，仅 1.37。

2.1.2 花梗与花序轴长比

花梗与花序轴长比(表 2)一定程度上反映了淫羊藿圆锥花序的紧凑度。测量花梗长度(圆锥花序上第一个花梗)及圆锥花序轴长，计算其比值。经 Spss16.0 软件方差分析，结果表明怀化、罗田、柳州及武宁居群的花梗与花序轴长的比值较大，分别为 0.125、0.119、0.108、0.105，南丰居群圆锥花序最紧凑，花梗与花序轴长比值仅为 0.052。

2.1.3 小花数

小花数是淫羊藿分类的主要指标之一。罗田居群小花序轴上着生的小花数多为 3 个，少数为 1~2 个，其他所有居群为 1~21 个不等，其中 1、3 或 5 个居多(表 2)。

2.1.4 株高

随机选择 50 株个体，测量其株高(茎基部至花序顶端的高度)(表 2)。结果经 Spss16.0 软件方差分析，各居群株高间存在显著差异。韶关居群、浏阳居群及永泰居群株高较高，分别为 44.1 cm、42.26 cm 及 41.45 cm，而武宁居群最矮，为 28.9 cm。

2.1.5 叶片干重

叶重是反映植株生物量及产量的重要指标。表 2 结果显示，不同居群生物量存在一定的差异显著

表 1 12 个箭叶淫羊藿居群 AFLP 分析的 8 对引物组合
Table 1 AFLP primer combinations of fragments scored for 12 individuals from *E. sagittatum*

编号 No.	引物对 Primers	
	EcoR I - A	Mse I - C
1	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AGC	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CGA
2	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AGT	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CAG
3	5-GAC TGC GTA CCA ATTC ACG	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CAC
4	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AAC	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CGT
5	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AGG	5-GAC TGC GTA CCA ATTC ACC
6	5-GAC TGC GTA CCA ATTC ACT	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CAC
7	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AGG	5-GAC TGC GTA CCA ATTC CGT
8	5-GAC TGC GTA CCA ATTC AAC	5-GAC TGC GTA CCA ATTC ACC

表 2 箭叶淫羊藿各居群主要形态量化指标分析
Table 2 Quantitative characteristics of 12 populations of *E. sagittatum*

居群 Population	叶长/叶宽 Leaf length/Leaf width	花梗/花序轴 Pedicel length/Main stem of inflorescence	小花数 Flower	株高 (cm) Plant height	叶片干重 (g/leaf) Leaf dry weight
LT	1.373 ± 0.055e	0.119 ± 0.010ab	3, 1~3	32.71 ± 1.04cde	0.131 ± 0.005c
ZY	1.617 ± 0.085de	0.095 ± 0.007bcde	3, 3~9	29.75 ± 0.71f	0.093 ± 0.006gh
LY	1.748 ± 0.021d	0.075 ± 0.003ef	3	42.26 ± 0.88ab	0.198 ± 0.008a
SG	1.817 ± 0.070cd	0.074 ± 0.010ef	3, 3~5	44.14 ± 0.71a	0.126 ± 0.013d
HH	2.082 ± 0.115bc	0.125 ± 0.004a	1, 3	30.52 ± 0.79ef	0.092 ± 0.009h
QZ	2.084 ± 0.062bc	0.077 ± 0.002def	3, 1~3	30.64 ± 0.80def	0.151 ± 0.009b
LZ	2.095 ± 0.130bc	0.108 ± 0.002abc	11, 3~9	30.26 ± 0.89f	0.062 ± 0.006j
NF	2.152 ± 0.102b	0.052 ± 0.002f	3, 1~3	34.13 ± 0.76c	0.116 ± 0.009e
WN	2.190 ± 0.070ab	0.105 ± 0.020abcd	1, 3	28.91 ± 0.71f	0.115 ± 0.011e
YT	2.356 ± 0.069ab	0.070 ± 0.006ef	13, 3~9	41.45 ± 0.72b	0.078 ± 0.014i
CL	2.361 ± 0.099ab	0.083 ± 0.004cde	1, 3	33.04 ± 0.77c	0.095 ± 0.006g
HS	2.469 ± 0.071a	0.076 ± 0.007ef	1, 1~3	30.11 ± 0.56f	0.098 ± 0.007f

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著性($p < 0.05$)。
Note: Different letters within the same column indicate significant differences at the 0.05 level.

性。罗田居群叶片较重，为 0.134 g/leaf，在 $\alpha = 0.05$ 水平上与大部分居群具显著性差异，而浏阳居群最重，为 0.199 g/leaf，柳州居群最轻，为 0.062 g/leaf。

2.1.6 形态量化数据聚类分析

对箭叶淫羊藿 12 个居群形态量化数据利用 Spss 软件进行分层聚类分析，分析结果(图 2)表明，各居群相对聚为 3 类，浏阳居群(LY)与韶关居

群(YT)聚为一类，显示出各自较强的形态相关性。

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 多态性分析

共扩增出 423 条带，平均每对引物可扩增出 53 条带，多态性条带 359 条，多态性比例 85.9%，平均每条引物扩增出多态性条带 45 条。其中共有条带 65 条，特异性条带 60 条，每个居群均有其特有带，可以将其逐一区分。

2.2.2 遗传多态性 UPGMA 分析

各居群遗传距离变化范围在 0.147 ~ 1.301 之间。基于遗传距离进行 UPGMA 聚类分析，结果显示(图 3)，柳州居群(LZ)最先分出，而后是慈利(CL)、镇远(ZY)和怀化(HH)居群聚为一个单系支

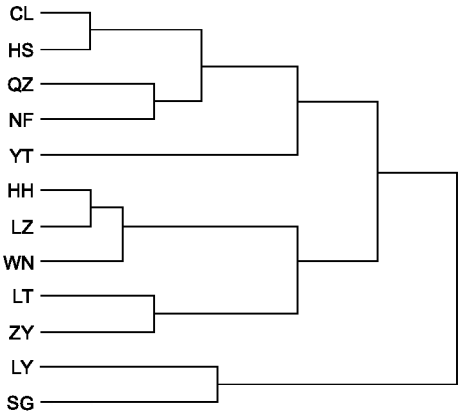


图 2 箭叶淫羊藿 12 个居群形态分层聚类图
Fig. 2 Hierarchical clustering diagram of main quantitative morphological characteristics of *Epimedium* populations

群(SG)聚为一类，罗田居群(LT)与镇远居群(ZY)、武宁居群(WN)、柳州居群(LZ)及怀化居群(HH)聚为一类，而慈利居群(CL)、黄山居群(HS)、衢州居群(QZ)、南丰居群(NF)及永泰居

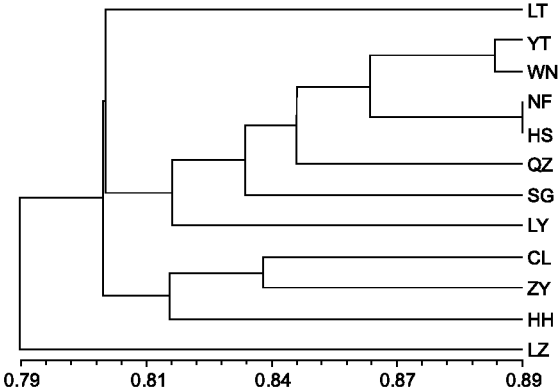


图 3 箭叶淫羊藿遗传多态性 UPGMA 分析
Fig. 3 UPGMA dendrogram based on AFLP data

分出。其他8个居群主要分布在华东地区,其中罗田居群和其他的7个居群明显分开。南丰居群(NF)与黄山居群(HS)最先聚类,随后与武宁居群(WN)及永泰居群(YT)聚为一类,然后相继与衢州居群(QZ)、韶关居群(SG)、浏阳居群(LY)聚在一起。

3 讨论

同园栽培实验保持了生境的一致性,能剔除表型变异中的环境因素,达到筛选基于遗传基础的稳定优异居群的目的。同园栽培在资源评价筛选、外来物种入侵机理研究等方面得到了广泛的利用。如Eriksen等^[14]通过同园栽培实验分析了北美有害杂草 *Centaurea solstitialis* 本地种与外来种的形态差异,明确了遗传因素在外来物种入侵中的作用。本研究采用同园栽培实验,保持了各居群生长环境的一致性,能较客观的分析不同居群间基于遗传基础导致的形态差异。

形态特征分析是资源本底调查及资源开发利用的基础。徐艳琴^[9]对箭叶淫羊藿、朝鲜淫羊藿及心叶淫羊藿进行了居群形态分析及地理分布调查。发现罗田、浏阳及怀化3个居群的形态特征具有一定的特异性。本研究发现,箭叶淫羊藿各居群在形态上表现出各自明显的差异,黄山居群叶片最细长,而罗田居群叶片长宽比最小。怀化、罗田居群的花梗与花序轴长比较大,圆锥花序展幅较宽,而南丰居群圆锥花序最紧凑。株高及叶片重方面,韶关居群株高最高,武宁居群最矮。浏阳居群叶片干重最重,而柳州居群最轻,反映了韶关居群,浏阳居群具有较高的单位生物量,可以作为大田生产的参考品种。另外,罗田居群显示了一定的特异性,其叶片长宽比最小,叶片干重相对较高,显示其生物量较高。小花序轴上着生的小花数多为3个,少数为1~2个。各居群其形态差异分析为进一步的资源筛选及产业化生产提供了一定的科学依据。

种质遗传多样性研究为药用植物资源研究的热点。吴卫等对中国及韩国黄芪、鱼腥草、穿龙薯蓣等开展了遗传多样性及地理起源评价^[15-17]。综合本研究各居群形态、遗传多样性分析及不同居群地理分布,发现各居群的遗传多样性与地理分布具有

密切的相关性。基于 AFLP 多态性条带进行的遗传距离聚类分析显示,广西柳州居群(LZ)最先分出,该居群与其他居群地理距离最远。永泰居群(YT)、武宁居群(WN)、南丰居群(NF)、黄山居群(HS)、衢州居群(QZ)、韶关居群(SG)、浏阳居群(LY)、罗田居群(LT)等华东和华中居群聚为一类,而且罗田居群(LT)最先分出,印证了其形态的特异性。慈利居群(CL)、镇远居群(ZY)、怀化居群(HH)等西南地区类群聚为一类(图3)。该结果说明箭叶淫羊藿不同居群的地理分布变化在一定程度上导致了其遗传物质及遗传多样性的变化。基于形态指标进行的聚类分析结果中,浏阳居群(LY)和韶关居群(SG)聚为一类,而黄山居群(HS)、衢州居群(QZ)、南丰居群(NF)、永泰居群(YT)等聚为一类,这些与遗传聚类结果表现出一定的相关性。但是形态聚类与遗传聚类分析还是有诸多不一致,而且形态聚类与地理分布的相关性也低于遗传聚类,表明箭叶淫羊藿形态的多样性,以及与遗传关系之间联系的复杂性。箭叶淫羊藿是一个分类学上极难处理的类群,有必要深入分析箭叶淫羊藿的种下多样性分布格局、不同地理居群形态变异的遗传多样性基础,以及不同地理分布与遗传基础的互作机制,为合理保护及开发利用箭叶淫羊藿资源提供理论依据。

参考文献:

- [1] Stearn W T. The genus *Epimedium* and other herbaceous Berberidaceae, including the genus *Podophyllum* [M]. Portland, Oregon, USA: Timber Press, 2002: 6.
- [2] 张燕君. 中国淫羊藿属的分类学研究[D]. 武汉: 中国科学院武汉植物园, 2009.
- [3] 应俊生. 中国植物志: 第29卷[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 263-298.
- [4] 应俊生. 淫羊藿属(小檗科)花瓣的演化与地理分布格局的研究. 植物分类学报[J], 2002, 40: 481-489.
- [5] Wu H, Lien E J, Lien L L. Chemical and pharmacological investigations of *Epimedium* species: A Survey[J]. *Prog Drug Res*, 2003, 60: 1-57.
- [6] 郭宝林, 肖培根. 中药淫羊藿主要种类评述[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 303-307.

- [7] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 229.
- [8] 何顺志, 郭宝林, 王晓春. 箭叶淫羊藿及近缘种的分类研究[J]. 贵州科学, 2003, 21(1-2): 102-106.
- [9] 徐艳琴. 三种药用淫羊藿的活性成分变异及居群遗传学分析[D]. 武汉: 中国科学院武汉植物园, 2008.
- [10] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿的生物活性成分及其开发策略研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 329-330.
- [11] 徐艳琴, 陈建军, 葛菲, 刘小丽, 王瑛. 淫羊藿药材质量评价研究现状与思考[J]. 中草药, 2010, 41(4): 661-663.
- [12] Colautti Robert I, Maron John L, Barrett Spencer C H. Common garden comparisons of native and introduced plant populations: latitudinal clines can obscure evolutionary inferences[J]. *Evol in Invasive Plants*, 2008, 2: 187-199.
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.
- [14] Eriksen R L, Desronvil T, Hierro J L, Kesseli R. Morphological differentiation in a common garden experiment among native and non-native specimens of the invasive weed yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) [J]. *Biol Invasions*, 2012, 14: 1459-1467.
- [15] 吴卫, 郑有良, 陈黎, 杨瑞武, 颜泽洪, 魏育明. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2003, 5: 70-77.
- [16] Na H J, Um J K, Kim S C, Koh K H, Hwang W J, Lee K M, Kim C H, Kim H M. Molecular discrimination of medicinal *Astragali radix* by RAPD analysis[J]. *Immunopharmac and Immunotoxic*, 2004, 26: 265-272.
- [17] 刘娟, 张春晖, 姜博. 应用 RAPD 技术探讨穿龙薯蓣遗传多样性及亲缘关系[J]. 时珍国医国药, 2007, 18: 2907-2909.

(责任编辑: 张 平)

欢迎订阅 2014 年《植物科学学报》

双月刊 大 16 开 国内定价 50 元 全年 300 元

邮发代号 38-103(国内) BM872(国外)

刊号 CN 42-1817/Q ISSN 2095-0837

《植物科学学报》是中国科学院主管、中科院武汉植物园主办、科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊,主要刊载植物学及各分支学科的原始研究论文。

栏目设置:特邀综述、系统与进化、生态与生物地理、遗传与育种、生理与发育、资源与植物化学、技术与方法、研究快报、学术讨论、重要书刊评介和学术动态等。

读者对象:科研院所和高等院校从事植物科学研究的科研人员、教师和研究生,以及相关学科、交叉学科的科技工作者。

《植物科学学报》为中国自然科学核心期刊,已被中国科学引文数据库核心库、《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文与引文数据库、中国生物学文献数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知识资源总库《中国科技期刊精品数据库》、中国期刊全文数据库、《中国药学文摘》、美国《化学文摘》、美国《生物学文摘》、美国《剑桥科学文摘:自然科学》、俄罗斯《文摘杂志》、日本《科学技术文献速报》、英国《国际农业与生物科学研究中心》文摘、波兰《哥白尼索引》、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)等二十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾相继获全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖、湖北省优秀期刊奖。

本刊已开通了网站和远程稿件管理系统(<http://www.plantscience.cn>),目前本刊所有过刊及现刊已全部上网,欢迎广大新老作者和读者在线投稿、查询使用过刊,继续关注和支持本刊。

订阅方式:①全国各地邮局均可订阅(邮发代号:38-103);②直接与本刊编辑部联系订阅(免收邮挂费)。

通讯地址:武汉市武昌磨山中科院武汉植物园内《植物科学学报》编辑部,邮编:430074

电话:027-87510755, 027-87510579; **QQ:** 424353337

E-mail: editor@wbgcas.cn; zwkxbjb@wbgcas.cn

<http://www.plantscience.cn>

欢迎赐稿, 欢迎订阅, 欢迎刊登广告