

· 药材与资源 ·

云南常见药用红景天的 RAPD 分析

虞泓^{1,2}, 朱荣勋¹, 李永谊¹, 和云峰^{1*}

(1. 云南英茂生物技术实验室, 云南 昆明 650106; 2. 云南大学生命科学学院 生态遗传学实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:目的 研究云南常见药用植物红景天的遗传背景。方法 采用 RAPD 技术对 3 种 6 个居群 59 个红景天样品进行了遗传关系研究。结果 大花红景天 3 个居群的多态位点百分率(PPB)分别为 37.97%、46.15%、39.45%, Nei's 基因多样性(h)分别为 0.110 3、0.143 7、0.137 1, Shannon's 信息指数(I)分别为 0.173 6、0.222 1、0.206 7, 物种水平的 PPB 为 70.47%, I 为 0.258 3, 基因分化系数 G_{st} 为 0.263 0; 长鞭红景天 2 个居群的 PPB 分别为 43.67%、44.42%, I 分别为 0.215 3、0.217 4, 物种水平的 PPB 为 65.51%, G_{st} 为 0.313 2, I 为 0.313 9; 云南红景天的 PPB 为 36.97%, I 为 0.188 1。结论 RAPD 分子标记可很好地用于红景天物种的分子鉴定和遗传背景研究。**关键词:** 大花红景天; 长鞭红景天; 云南红景天; 遗传多样性; Shannon's 信息指数; 随机扩增多态 DNA
中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)01-0096-04

RAPD analysis of common medicinal plants of *Rhodiola* L. in Yunnan ProvinceYU Hong^{1,2}, ZHU Rong-xun¹, LI Yong-yi¹, HE Yun-feng¹

(1. Yunnan Immol Laboratory of Biotechnology, Kunming 650106, China; 2. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: **Objective** To analyze the hereditary background of common species from *Rhodiola* L. in Yunnan Province. **Methods** Fifty-nine samples of six populations in three natural medicinal species from *Rhodiola* L. were studied by RAPD method. **Results** The percentage of polymorphic bands (PPB) of three populations from *R. crenulata* were 37.97%, 46.15%, and 39.45% respectively; the Nei's gene diversities (h) were 0.110 3, 0.143 7, and 0.137 1, respectively; the Shannon's information index (I) were 0.173 6, 0.222 1, and 0.206 7, respectively; at the special level, the PPB was 70.47%, I was 0.258 3; the genetic differentiation (G_{st}) was 0.263 0. The PPB of two populations from *R. fastigiata* were 43.67% and 44.42%, I were 0.215 3 and 0.217 4, respectively; at the special level, the PPB was 65.51%, G_{st} and I were 0.313 2 and 0.313 9, respectively; the PPB of *R. yunnanensis* was 36.97%, I was 0.188 1. **Conclusion** RAPD molecular marker could be used to molecular authentication and genetic diversity analysis of medicinal species from *Rhodiola* L.

Key words: *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu; *Rhodiola fastigiata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu; *Rhodiola yunnanensis* (Franch.) S. H. Fu; genetic diversity; Shannon's information index; RAPD

红景天为景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)多年生草本或亚灌木植物,多生长在海拔 3 000~5 000 m 的雪域高原及干旱、低温、缺氧、紫外线照射强、风大、积雪的石灰岩和砾岩的恶劣环境中^[1]。红景天属植物在全世界有 90 多种,分布于欧、亚和北美的高寒山区。我国有 70 多种分布于东北、华北、西北、西南等地,云南有 24 种,主要分布于横断山区^[2]。现代医药研究表明:红景天具有抗寒冷、抗缺氧、抗疲劳、抗微波辐射、抗衰老、抗肿瘤

及抗病毒、强心、增强免疫力等生理、药理作用,并表现出很好的双向调节作用。而且其抗疲劳、抗缺氧和增强免疫力作用超过人参、刺五加和绞股蓝;益智作用超过刺五加,又无人参兴奋过强和刺五加易致便秘的缺点,因此格外受到重视。

关于红景天遗传多样性及其遗传结构研究报道十分少见,目前缺乏开展红景天引种、驯化、繁育和遗传育种以及栽培等工作的遗传基础资料。RAPD 是研究居群遗传多样性快速、简便、有效的方法。因

* 收稿日期: 2004-03-28

基金项目: 中药现代化科技产业(云南)基地专项(2002ZY-18)

作者简介: 虞泓(1962—),教授,博士生导师,现从事药用植物引种驯化、遗传育种、GA P、化学和生物指纹图谱研究。

Tel: (0871) 7392184 Fax: (0871) 7392576 E-mail: fisher@ynimmol.com

此,开展红景天居群 RAPD 遗传多样性研究,将揭示红景天的遗传多样性及其遗传结构,可以为红景天的引种驯化和遗传育种提供理论依据和基础资料。本研究试图利用 RAPD 分子标记技术,开展红景天居群遗传多样性和遗传结构分析,为红景天药用植物保护、引种驯化、遗传育种、繁育栽培和 GAP 种植提供理论依据和方法措施。同时,对红景天药材、GAP 种植优良品种进行 DNA 分子标记,为红景天 DNA 指纹图谱奠定基础。

利用 RAPD 技术对云南常见药用红景天原植物的 3 个种 6 个居群 59 个个体进行了随机引物扩增,对红景天不同种、不同居群间的亲缘关系和遗传多样性进行了探讨,为红景天引种驯化和繁育栽培、GAP 规范化种植和分子指纹鉴定提供素材和依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料:供试的 3 个种 6 个居群 59 个个体分别采自云南省中甸、丽江、怒江,并引种驯化种植在香格里拉县小中甸镇共卓社引种驯化基地(海拔 3 300 m),样品来源见表 1。

表 1 供试样品材料

Table 1 Plant materials for test

种 名	产 地	居群	数量	编 号	海拔/m
大花红景天	中甸哈巴雪山	HA	10	HA 1-HA 25	3 500
	丽江玉龙雪山	HB	10	HB 2-HB 20	3 500
	怒江高黎贡山	HC	9	HC 1-HC 9	3 500
长鞭红景天	中甸格咱红山	HD	10	HD 1-HD 10	4 200
	中甸朗都雪山	HH	10	HD 1-HD 13	4 100
云南红景天	怒江高黎贡山	HG	10	HG 1-HG 15	3 100

1.2 实验方法

1.2.1 红景天基因组总 DNA 的提取:基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[3],并稍作修改。0.5 g 左右的植物组织加入到 4 mL 预热到 65℃ 的 2 × CTAB(含 2% β-巯基乙醇)中,研磨成糊状,65℃ 水浴 1 h,冷却至室温,加入 1/3 体积 5 mol/L 的 KAc 冰浴 1 h,4 000 × g 离心 3 min,取上清液,CI 抽提液(氯仿-异戊醇= 24:1)抽提 2 次,取上清液加 3/4 体积的异丙醇, - 20℃ 静置 30~ 60 min,12 000 × g 离心 10 min,70% 乙醇洗 2 次,无水乙醇洗 1 次。加 400 μL 1 × TE,室温静置 2 h,使 DNA 充分溶解,1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用 λDNA (20、50、100 ng/μL)标定,利用 Kodak 1D 分析软件分析并标定到 20 ng/μL 备用。

1.2.2 RAPD 扩增:引物筛选:从 80 个随机寡核苷酸引物(上海生工)中筛选出 21 个扩增良好、带型清晰的引物用于正式扩增。见表 2。

表 2 引物扩增结果

Table 2 Primers for amplification

引 物	序 列	引 物	序 列
S1	GTTTCGCTCC	S217	CCAACGTCGT
S5	TGCGCCCTTC	S366	CACCTTTCCC
S8	GTCCACACGG	S399	GA GTGGTGAC
S12	CCTTGACGCA	S461	GTA GCACTCC
S21	CAGGCCCTTC	S462	TCGGCACGCA
S35	TTCCGAACCC	S463	CTGA TACGCC
S82	GGCACTGAGG	S464	GTGTCTCAGG
S94	GGA TGA GACC	S465	CCCCGGTAAC
S201	GGGCCACTCA	S466	GTGGGCTGAC
S208	AACGXGACA	S512	ACA GGTGCGT
S212	GGGTGTGTAG		

反应体系:采用 25 μL 反应体系,其中模板 DNA 40 ng,20 mmol/L MgCl₂ (Taq 酶配套),2.5 μL 10 × Buffer (Taq 酶配套),dNTPs 为 0.2 mmol/L (上海生工),Taq 酶 (Shanghai Promega) 2.0 U,引物(上海生工)2.64 ng/μL。

扩增程序:反应在 PE9700 型 PCR 仪(美国应用生物系统公司)进行,采用降落式多聚酶链式反应(Touch-down PCR)程序,循环参数为 94℃ 预变性 5 min,然后经 94℃ 变性 30 s,40℃ 梯度降温退火 30 s(每个循环降温 1℃),72℃ 延伸 60 s,循环 14 次后,将退火温度恒定在 34℃ 再循环 26 次,最后 72℃ 延伸 7 min,灭菌水代替模板 DNA 作空白对照。

产物检测:扩增产物在 1 × TAE、2.0% 的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,用 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder 作分子量标记(MBI Fermentas),Kodak 1D 凝胶成像系统照相,曝光 2 min。

1.2.3 数据统计分析:利用 Kodak 1D 分析软件分析,每个样品的扩增带按有或无记录,“有”赋值为 1,“无”赋值 0,得到原始数据矩阵。弱带及重复性不好的条带不予统计。利用 PAUP* Beta 10 for Power PC 商用软件包和 PopGene 32 共享软件计算统计所得数据。

2 RAPD 扩增结果

本实验中 21 个随机寡核苷酸引物所检测到的片段大小在 0.24~ 2.2 kb,条带清晰可辨,部分结果见图 1。PAUP 软件运算得到红景天 59 个个体间的非加权算术平均数(UPGMA)聚类树,用靴带值(500 次重复抽样)检验各分支的支持强度,见图 2。利用 PopGene 32 软件,假定 Hardy-Weinberg 平衡得到红景天居群的遗传距离,物种和居群水平的平均等位基因数(A)、有效等位基因数(A_e)、Nei's 基因多样性(h)、Shannon's 信息指数(I)和多态位点比率(PPB),见表 3;红景天居群基因分化系数

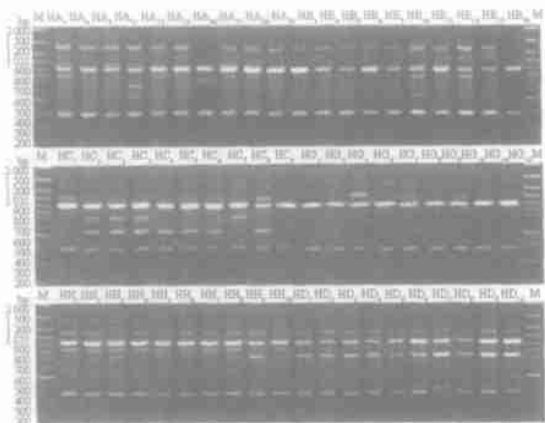


图 1 引物 S21 对红景天不同个体的扩增结果(图上的数据为个体编号)

Fig. 1 RAPD amplified products generated by S21 to different samples of Rhodiola L. (data in figure are No. of samples)

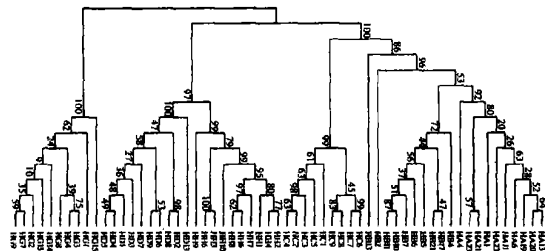


图 2 红景天 59 个样品 UPGMA 系统树(基于靴带检验, 分支上的数字是 500 次检测的靴带值)

Fig. 2 Dendrogram of 59 samples of Rhodiola L. by UPGMA (based on bootstrap, numbers on branches are bootstrap estimates for 500 replicates)

(G_{st}), 见表 4。

3 结果分析与讨论

3.1 红景天居群的遗传变异: RAPD 分子标记中, PPB 值的大小代表了居群遗传多样性水平的高低。祖元刚等用等位酶分析技术对分布于黑龙江大海林林业局高山红景天 *R. sachalinensis* A. Bor. 天然分布区内 3 个亚居群及吉林长白山 1 个亚居群的 9 种酶系统 18 个位点进行了遗传分析, 结果表明居群内存在一定的遗传变异 (PPB = 30.55%, $A = 1.333$)^[4]。颜廷芬等用等位酶分析技术对分布于黑龙江大海林林业局平顶山及吉林长白山北坡的 4 个海拔梯度的长白红景天 *R. angusta* Nakai 的遗传多样性及遗传分化进行了初步分析, 结果表明长白红景天天然居群中存在一定的遗传变异 ($A = 1.48$, PPB = 46.7%, $H_e = 0.195$)^[5]。在本研究中大花红景天居群和长鞭红景天居群水平的 PPB 平均分别

表 3 居群内部和居群间的平均等位基因数、有效等位基因数、Nei 氏基因多样性、Shannon's 指数、Shannon 多样性基因遗传分化系数及多态位点比率

Table 3 Average number of alleles, effective alleles, Nei's gene diversity, Shannon's information index of diversity, gene differentiation by Shannon diversity, and PPB within and among populations from Rhodiola L.

品 种	居群	A	A _e	h	I	I _{st}	PPB/%
大花红景天	HA	1.379 7	1.172 2	0.110 3	0.173 6		37.97
	HB	1.461 5	1.232 4	0.143 7	0.222 1		46.15
	HC	1.394 5	1.230 6	0.137 1	0.206 7		39.45
长鞭红景天	居群均数	1.411 9	1.211 7	0.130 4	0.200 8	0.222 6	41.19
	物种数	1.704 7	1.254 1	0.161 4	0.258 3		70.47
	HH	1.444 2	1.231 1	0.141 5	0.217 4		44.42
云南红景天	HD	1.436 7	1.227 6	0.140 1	0.215 3		43.67
	居群均数	1.440 5	1.229 4	0.140 8	0.216 4	0.310 8	44.05
	物种数	1.655 1	1.347 5	0.206 8	0.313 9		65.51
云南红景天	HG	1.369 7	1.205 4	0.123 8	0.188 1		36.97

A-等位基因数 A_e-有效等位基因数 h-Nei's 基因多样性 I-Shannon's 信息指数 I_{st}-Shannon 多样性基因遗传分化系数 PPB-多态位点比率

A-allele number A_e-effective allele number h-Nei's gene diversity I-Shannon's information index I_{st}-gene differentiation by Shannon diversity PPB-percentage of polymorphic bands

表 4 云南长鞭红景天和在大花红景天居群遗传分化分析

Table 4 Population genetic differentiation G_{st} analysis of *R. fastigiata* and *R. crenulata* from Yunnan Province

种	H_t	H_s	D_{st}	G_{st}
长鞭红景天(HH+ HD)	0.206 8	0.142 1	0.064 7	0.313 2
大花红景天(HA+ HB+ HC)	0.162 4	0.119 7	0.042 7	0.263 0

G_{st} -基因遗传分化系数 H_t -总基因遗传多样性 H_s -种群基因遗传多样性 D_{st} -居群间基因多样性

G_{st} -coefficient of gene differentiation H_t -total gene diversity H_s -gene diversity within population D_{st} -gene diversity among populations

为 70.47% 和 65.51% (表 3), 均显著高于高山红景天和分布范围狭窄的长白红景天, 这与大花红景天和长鞭红景天所具有的丰富的蕴藏量和广泛分布的状态一致。

从物种水平看, 大花红景天 PPB 值 (70.47%) 大于长鞭红景天 PPB 值 (65.51%); 从居群水平看, 大花红景天居群平均 PPB 值 (41.19%) 小于长鞭红景天居群平均 PPB 值 (44.05%), 云南红景天居群 PPB 值最小 (36.97%)。从物种水平看, Nei's 基因多样性, 长鞭红景天 (0.206 8) > 大花红景天 (0.161 4); Shannon's 信息指数, 长鞭红景天 (0.313 9) > 大花红景天 (0.258 3)。从居群平均水平看, Nei's 基因多样性也是长鞭红景天 (0.140 8) > 大

花红景天(0.130 4); Shannon's 信息指数也是长鞭红景天(0.216 4) > 大花红景天(0.200 8)。由此可见,除了物种水平的 PPB 值以外,长鞭红景天遗传多样性总体大于大花红景天。大花红景天 PPB 值大于长鞭红景天可能是由于长鞭红景天检测居群数少于大花红景天检测的居群数。

3.2 红景天居群的遗传多样性及基因型的聚类分析:从 RA PD 分子标记聚类树上可以看出,不同种的红景天属植物得到了明确的区分,每种红景天不同居群的不同个体均在种一级聚在一起,表明 RA PD 分子标记可以作为其种的分子鉴定依据。在居群水平上,同为中甸出产的 2 个长鞭红景天居群从遗传距离和遗传一致度上得到了良好的分辨,大花红景天的怒江高黎贡山居群也与另 2 个大花红景天居群明显分开(图 2,表 5),表明 RA PD 分子标记对同种红景天不同居群有较好的鉴别力。大花红景天中甸哈巴雪山和丽江玉龙雪山居群遗传相似性最大,因为 2 个居群分布较近,仅为金沙江一江之隔,它们的遗传距离较小为 0.032 5,遗传一致度较大为 0.968 0(表 5);两个居群存在较强烈的基因流动,其基因流 N_m 值为 3.309 2,远大于大花红景天的平均值 $N_m = 1.401 4$ 。

表 5 红景天 6 个居群的 Nei 氏遗传距离(斜下)及遗传特性

Table 5 Nie's genetic distance (below diagonal) and genetic identity in six populations of *Rhodiola* L.

居群	HA	HB	HC	HH	HD	HG
HA	* * * *	0.968 0	0.910 1	0.829 6	0.825 9	0.805 4
HB	0.032 5	* * * *	0.921 5	0.827 0	0.815 1	0.811 0
HC	0.094 2	0.081 8	* * * *	0.799 5	0.797 2	0.784 2
HH	0.186 9	0.190 0	0.223 8	* * * *	0.856 4	0.794 9
HD	0.191 2	0.204 4	0.226 7	0.155 0	* * * *	0.799 8
HG	0.216 4	0.209 5	0.243 1	0.229 5	0.223 4	* * * *

将红景天不同种特有带和居群特有带进行克隆测序,转化为 SCAR 标记,则可对红景天属药用植物进行种或居群的 DNA 分子鉴定,并在一定程度上区分其地道性。

3.3 红景天居群的遗传分化:Nei (1973)把总基因多样性(H_t)分解为居群内基因多样性(H_s)和居群间基因多样性(D_{st}),即: $H_t = H_s + D_{st}$,而 $G_{st} = D_{st} / H_t$,所以,居群的基因分化系数 $G_{st} = (H_t - H_s) /$

H_t 。由表 5 可知,大花红景天 3 个居群的基因分化系数 G_{st} 为 0.263 0,即在总的遗传变异中有 26.3% 的变异存在于居群间,73.7% 的变异存在于各居群内;长鞭红景天 2 个居群的 G_{st} 为 0.313 2,即在总的遗传变异中有 31.32% 的变异存在于居群间,68.68% 的变异存在于各居群内。根据 Shannon's 信息指数,Shannon 多样性基因遗传分化系数 $I_{st} = (H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$,大花红景天 $I_{st} = 0.222 6$,长鞭红景天 $I_{st} = 0.310 8$,与两者的 G_{st} 值基本一致。研究显示,长鞭红景天居群间的遗传分化程度高于大花红景天。

Hamrick 等(1990)认为影响居群遗传变异大小的主要因素依次为:繁育系统、分布范围和生活型,红景天繁育系统均以异花授粉为主,有性生殖兼无性生殖。所以,影响居群遗传变异的主要因素是分布范围、地理位置及小生境的差异^[6]。调查表明,大花红景天一般生长于雪线附近的流石滩上,分布于海拔 3 800~ 5 500 m 的地方;长鞭红景天从海拔 2 500~ 5 400 m 内均有分布,适应幅度也较大。所以,长鞭红景天($G_{st} = 0.313 2$)的遗传分化程度大于大花红景天($G_{st} = 0.263 0$),而两者的 G_{st} 值又均大于分布范围狭窄的长白红景天($G_{st} = 0.134$)。

References

- [1] Xu L, Xu H H, Huang Z S, et al. *New Techniques of Cultivation for Good Agricultural Practice (GAP) and Industrializing Development on the Chinese Rare medicinal Herbs* (中国名贵药材规范化栽培技术与产业化开发新技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 2001.
- [2] Institutum Botanicum Kunmingense Academiae Sinicae. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Tomus 8 Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Dolye J J, Dolye J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [4] Zu Y G, Yan T F, Zhou F J. A preliminary study on genetic variation endangered mechanism of *Rhodiola sachalinensis* natural population [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1998, 18 (3): 304-310.
- [5] Yan T F, Zhou F J, Yan X F, et al. Genetic diversity and population differentiation of *Rhodiola angusta* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1999, 19(2): 189-194.
- [6] Brown A H D, Frankle O H, Marshall D R, et al. *The Use of Plant Genetic Resources* [M]. New York: Cambridge University Press, 1989.