

丽江山慈菇 RAPD 遗传变异初探

王海英¹, 虞泓^{1,3*}, 李南高², 何显静¹, 张金渝¹, 周利杰¹

(1. 云南大学生命科学院 生态遗传学实验室, 云南 昆明 650091; 2. 云南英茂生物技术实验室, 云南 昆明 650106; 3. 昆明制药集团股份有限公司, 云南 昆明 650100)

摘要:目的 研究丽江山慈菇 *Iphigenia indica* 遗传变异及遗传结构。方法 采用 RAPD 技术, 对产自云南的 3 个居群进行 DNA 指纹检测。结果 筛选出 20 个随机引物, 对 3 居群扩增共产生 120 条 DNA 片段, 在 0.2~3 kb, 其中 71 条谱带具有遗传多态性, 约占 59.17%, 平均每个引物扩增的 DNA 带数是 3.55。Shannon index 在丽江玉龙雪山居群 (Ca) 为 0.199 4, 大理宾川鸡足山居群 (Cb) 为 0.200 7, 丽江永胜片角镇居群 (Cc) 为 0.254 8; 居群平均水平为 0.218 3, 物种水平为 0.288 6。Nei's genetic identity 在 Ca 和 Cb 居群间为 0.930 9; 在 Ca 和 Cc 居群间为 0.932 7; 在 Cb 和 Cc 居群间为 0.946 6。居群间基因分化系数 G_{ST} 为 0.204 4。结论 RAPD 分析可为丽江山慈菇保护对策和措施的制定, 遗传育种和 GAP 种植方法及标准的制定, 提供理论依据和基础资料。

关键词: 丽江山慈菇; RAPD; 遗传多态性

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0685-04

Preliminary analysis on genetic variation of *Iphigenia indica* by RAPD

WANG Hai-ying¹, YU Hong^{1,3}, LI Nan-gao², HE Xian-jing¹, ZHANG Jin-yu¹, ZHOU Li-jie¹

(1. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Immunology Laboratory of Biotechnology of Yunnan, Kunming 650106, China;

3. Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

Abstract: **Object** To study on the genetic diversity and genetic structure of *Iphigenia indica* Kunth. **Methods** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was applied to detect DNA fingerprints of three populations of *I. indica* from Yunnan Province. **Results** Twenty primers were screened, and a total of 120 DNA fragments were amplified ranging from 0.2—3 kb, among which 71 (59.17%) were polymorphic. The average number of DNA band produced by each primer was 3.55. The Shannon index was 0.199 4 in Ca population, 0.200 7 in Cb population, 0.254 8 in Cc population, respectively; the average value of populations was 0.218 3. The Shannon index was 0.288 6 in species. Nei's genetic identity was 0.930 9 between Ca and Cb, 0.932 7 between Ca and Cc, 0.946 6 between Cb and Cc. G_{ST} within population was 0.204 4. **Conclusion** For the establishment of protective tactic and measure, and of the standard of good agriculture practice (GAP) growth and heredity breeding, RAPD analysis provides *I. indica* with theoretical foundation and basal data.

Key words: *Iphigenia indica* Kunth; RAPD; genetic variation

丽江山慈菇 *Iphigenia indica* Kunth (2n=22)^[1] 属百合科 (Liliaceae) 的山慈菇属 (*Iphigenia* Kunth), 在中国仅分布单属单种, 主产于云南中部至西北部, 四川西南部, 贵州西部和西藏等省区也有分布, 生于 1 000~3 000 m 松林下或山坡草地, 酸性砂壤, 红壤^[2]。云南省主要分布于昆明、曲靖、玉溪、楚雄、大理、丽江、保山、鹤庆、宾川。丽江山慈菇具有较高的药用价值, 全株为提取秋水仙碱 (colchicine) 的原料, 秋水仙碱对肝癌、乳腺癌、食道癌、皮肤癌、

淋巴瘤肉瘤均有抑制作用; 鳞茎入药, 有毒, 民间用于散寒平喘, 止咳化痰, 拔毒消肿, 软坚散结^[3]。

据调查, 丽江山慈菇在云南原分布于滇东、滇中至滇西北的一些地区, 近年来由于人为的过度采挖和生境不断遭到破坏, 滇中的丽江山慈菇居群急剧减少, 处于灭绝的边缘, 滇西北的自然居群也有缩小趋势。据此现状, 对丽江山慈菇物种种质资源及多样性的保护已迫在眉睫。但一直以来, 丽江山慈菇遗传多样性以及遗传结构等方面的研究报道极少, 缺乏

* 收稿日期: 2003-11-20

基金项目: 昆明制药集团资助项目; 云南大学省级生物技术人才培养基地资助项目

作者简介: 王海英 (1978—), 女, 湖南怀化人, 在读硕士研究生, 研究方向为植物遗传与进化。

* 通讯作者 Tel: (0871) 7392184 Fax: (0871) 7392576 E-mail: fisher@public.km.yn.cn

开展丽江山慈菇引种驯化、遗传育种以及保护生物学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,本实验对丽江山慈菇进行 RAPD 分子标记,旨在揭示丽江山慈菇的遗传变异和遗传结构,为丽江山慈菇的保护生物学、遗传育种、GAP 种植以及合理开发利用丽江山慈菇药材资源提供可利用的基础资料。

1 材料与方法

1.1 植物材料:材料引种至云南昆明官渡区小哨乡白汉场英茂生物实验室基地(海拔 2 100 m)。材料来源见表 1。

表 1 丽江山慈菇三居群的来源

Table 1 Origin of three populations of <i>L. indica</i>				
编号	来源	海拔/m	样品数/株	生长环境
1	丽江玉龙雪山 (Ca)	2 593	20	松林边缘,山坡草地
2	大理宾川鸡足山 (Cb)	2 360	20	松林边缘,山坡草地
3	丽江永胜片角镇 (Cc)	2 245	20	松林边缘,山坡草地

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取:采用改良后的 CTAB 法^[4,5]提取基因组 DNA,每株取 0.3~0.5 g 新鲜叶片。

总 DNA 用含 0.5 μg/mL 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 的 1% 琼脂糖凝胶 (agarose gel) 电泳检测,用 25, 50, 75, 100 ng 的 λDNA 作为标定标准。模板 DNA 工作浓度平衡为 10 ng/μL。

1.2.2 RAPD 扩增反应及检测:从 3 个居群中各取 2 份 DNA 样品进行预备实验,共选出 20 个能获得清晰条带,反应稳定的随机引物,引物序列见表 2。

表 2 RAPD 引物序号与序列

Table 2 RAPD primers and their sequences			
引物	序列 5'~3'	引物	序列 5'~3'
OPA 08	GTACGTA GG	OPF08	GGGATA TCGG
OPA 11	CAATCGCCGT	OPF14	TGCTGCA GGT
OPA 15	TTCCGAACCC	OPG12	CAGCTCA CGA
OPB05	TGCGCCCTTC	OPG13	CTCTCCGCCA
OPB08	GTCCACACGG	OPP01	GTA GCACTCC
OPB18	CCACA GCA GT	OPP02	TCGGCACGCA
OPB20	GGACCCTTAC	OPP03	CTGA TACGCC
OPD11	AGCGCAATTG	OPT01	GGGCCACTCA
OPD13	GGGGTGACGA	OPT17	CCAA CGTCGT
OPF02	GAGGATCCCT	OPR20	ACGGCAA GGA

反应体系总体积为 25 μL: 10×buffer, 1 U TaqDNA 酶 (Promega), 0.2 mmol/L dNTP, 33 ng/μL 随机引物 (上海 Sangon 合成, Operon 公司 10 碱基随机寡核苷酸引物), 2 mmol/L MgCl₂, 20 ng 模板, 去离子水。对照加入除模板 DNA 外的以上各成分,用去离子水代替总 DNA。

PCR 扩增程序:使用美国 PE 公司的

PE9700PCR 仪。本实验采用英茂生物技术实验室 DNA 室改进的 TD-down 程序进行 RAPD 扩增,经过大量的优化工作,具有带型清晰,稳定的特点。扩增产物用含 0.5 μg/mL EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 1×TAE,电压为 85 V, 90~120 min 后,使用 Kodak Image Station 440CF 凝胶成像系统对 RAPD 谱带进行凝胶成像。图 1 为引物 S128 对丽江玉龙雪山、大理宾川鸡足山、丽江永胜片角镇居群各 20 个个体进行 PCR 扩增所产生的 RAPD 指纹图谱。

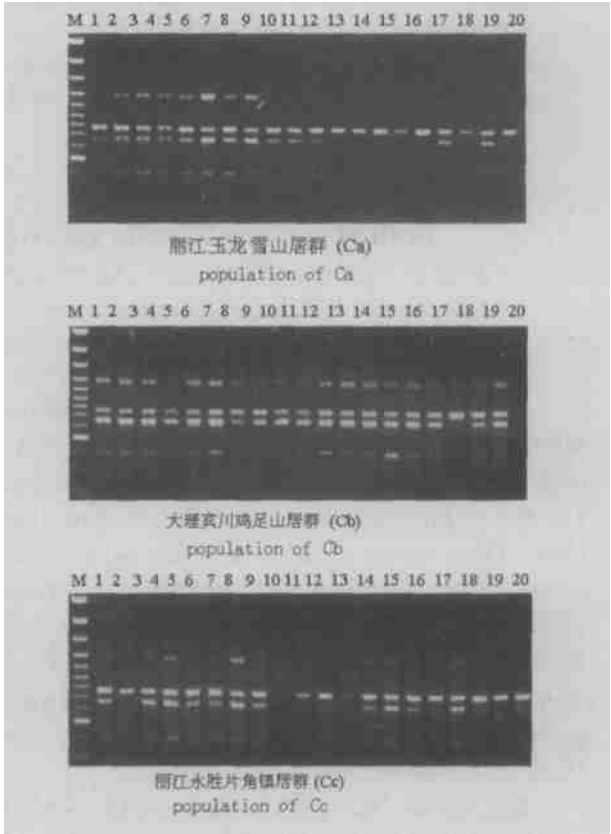


图 1 RAPD 引物 S128 对丽江山慈菇 3 个居群 (Ca, Cb, Cc) 扩增的 DNA 指纹图谱

Fig 1 DNA fingerprints of three populations of *L. indica* (Ca, Cb, and Cc) by using RAPD primer S128

1.2.3 数据统计分析:RAPD 是显性标记,属于同一位点的产物按扩增阳性(1),扩增阴性(0)和缺失(.)记录电泳带谱,形成 RAPD 表型数据矩阵用于进一步分析。使用 POPGENE 软件,统计多态条带比率 (PPB),计算扩增产物的 Shannon information index, Nei's genetic identity, genetic distance, effective number of A lleles, 以及 G_{st} 等。

2 结果和分析

2.1 遗传多样性:在丽江山慈菇 3 个居群中,20 个

RA PD 引物共扩增 120 条重复性高的清晰条带, 相对分子质量在 200~ 3 000, 平均每个引物可扩增出 6 条带; 其中有 71 条为多态, 多态比率 (PPB) 为 59. 17%, 平均每个 RA PD 引物可获得 3. 55 个多态条带。片角镇居群多态位最强, 为 41. 67%; 3 居群的平均多态位 36. 95% 明显低于物种的多态位 59. 17% (表 3), 多态位主要分布在物种水平。Shannon information index 在 Ca 居群为 0. 199 4 < Cb 居群 0. 200 7 < Cc 居群 0. 254 8, Cc 居群遗传多样性较丰富, 3 居群平均水平 0. 128 3 (表 4)。

表 3 RAPD 遗传多态性

Table 3 Genetic variation of RAPD

居 群	样本数	总条带	多态条带	PPB ¹⁾ 多态条带比率/%
丽江玉龙雪山 (Ca)	20	120	41. 00	34. 17
大理宾川鸡足山 (Cb)	20	120	42. 00	35. 00
丽江永胜片角镇 (Cc)	20	120	50. 00	41. 67
平均值	20	120	44. 30	36. 95
物种	60	120	71. 00	59. 17

1) Percentage of polymorphic bands (PPB)

表 4 丽江山慈菇遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *L. indica*

居 群	na ¹⁾	ne ²⁾	h ³⁾	I ⁴⁾
丽江玉龙雪山 (Ca)	1. 341 7	1. 231 9	0. 135 6	0. 199 4
大理宾川鸡足山 (Cb)	1. 350 0	1. 238 1	0. 136 9	0. 200 7
丽江永胜片角镇 (Cc)	1. 416 7	1. 323 2	0. 176 9	0. 254 8
平均值	1. 369 3	1. 284 4	0. 147 8	0. 218 3
物种	1. 591 7	1. 314 9	0. 188 3	0. 288 6

1) 平均观察等位基因数; 2) 平均有效等位基因数; 3) 遗传多样性指数; 4) Shannon 多样性指数

1) Observed number of alleles; 2) Effective number of alleles; 3) Nei's (1973) gene diversity; 4) Shannon's Information index

2. 2 遗传分化: 丽江山慈菇 3 个居群总的基因多样性指数 h_t 是 0. 188 3, 居群内多样性指数 h_s 是 0. 149 8, 居群间基因分化系数 G_{st} 为 0. 204 4。Hogbion 和 Peakall 总结了一些物种的 RA PD 分析结果, 发现异交物种的遗传变异大多分布在居群之内, 居群间的遗传变异通常占 27% 以下^[6]。丽江山慈菇有 79. 56% 的遗传变异来自居群内, 20. 44% 来自居群间, 遗传变异主要分布在居群内。

2. 3 遗传关系: 表 5 列出 3 居群的 Nei's genetic identity 以及 genetic distance。Nei's genetic identity 在 Ca 和 Cb 居群间为 0. 927 0 < Ca 和 Cc 居群间的 0. 928 1 < Cb 和 Cc 居群间的 0. 942 0, Cb 和 Cc 居群间的遗传一致度最大, 在 U PGMA 聚类分析中, Cb 和 Cc 居群聚在一起, Ca 居群单独聚为一类。

3 讨论与展望

表 5 丽江山慈菇 3 居群的遗传一致度以及遗传距离

Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance among three populations of *L. indica* (Ca, Cb, and Cc)

	Ca (pop 1)	Cb (pop 2)	Cc (pop 3)
Ca	-	0. 927 0	0. 928 1
Cb	0. 075 8	-	0. 942 0
Cc	0. 074 7	0. 059 8	-

* Nei's genetic identity (遗传一致度) (above line) and genetic distance (遗传距离) (below line)

对丽江山慈菇 3 居群进行 RA PD 检测分析, 丽江山慈菇居群间的遗传多样性较丰富。遗传变异主要来源于居群内个体间。Cb 和 Cc 居群间的遗传一致度最大, 可认为这两个居群亲缘关系较近。

生物多样性保护的关键之一是保护物种, 更确切的是保护物种的遗传多样性或进化潜力。从遗传学角度, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。遗传多样性的降低可导致其适应能力降低、有害隐性基因表达增加及经济性状衰退, 最终导致物种退化。丰富的遗传多样性则意味着较高的适应生存能力, 蕴涵着较大的进化潜能以及比较丰富的育种和遗传改良能力^[7]。与百合科植物比, 川百合的 PPB 为 83. 33%, 紫斑百合 PPB 值在 82. 26%~ 93. 94%^[8], 丽江山慈菇的物种 PPB 仅为 59. 17%, 居群平均 PPB 为 36. 95%, 相对较低。因此, 丽江山慈菇遗传多样性的保护是关键, RA PD 指纹图谱的建立, 可为保护对策和措施的制定提供科学依据。

分析云南英茂生物技术实验室药物室提供的 3 居群鳞茎秋水仙碱含量值: 丽江永胜片角镇 (Cc) 居群鳞茎秋水仙碱含量在 0. 283 7%~ 0. 573 8%, 平均含量为 0. 457 5, 丽江玉龙雪山 (Ca) 居群鳞茎秋水仙碱含量在 0. 308 4%~ 0. 507 9%, 平均含量为 0. 385 2%, 大理宾川鸡足山 (Cb) 居群鳞茎秋水仙碱含量在 0. 205 3%~ 0. 555 5%, 平均含量为 0. 278 65%; 取 3 居群各 10 个个体鳞茎有效成分含量值作为变量, 使用 SAS 8. 0 统计软件^[9]进行分析, 所得结果见表 6。

对鳞茎秋水仙碱含量值进行聚类分析, Cb 和

表 6 丽江山慈菇鳞茎有效成分 SAS 分析

Table 6 SAS analysis of effective ingredient in bulbs of *L. indica*

样 本	样本数	变异系数	四分位极差	方差
丽江玉龙雪山 (Ca)	10	19. 063 8	0. 086 6	0. 005 4
大理宾川鸡足山 (Cb)	10	22. 215 4	0. 084 5	0. 008 0
丽江永胜片角镇 (Cc)	10	17. 494 6	0. 058 0	0. 006 4

Cc 两居群聚在一起,这与 RAPD 分析中 Cb 居群和 Cc 居群遗传一致度最大且聚为一类相一致;所进行的巢式方差分析结果显示鳞茎秋水仙碱含量的变异有 89.24% 存在于居群内个体间,10.75% 存在于居群间。因此,在居群内个体间选育高含量单株,培养无性系品种,利用不同地理分布区高含量植株进行杂交育种,在 GAP 种植中具有现实的意义。

丽江山慈菇鳞茎秋水仙碱含量在居群内个体间和居群间的变异程度及其聚类分析,与其 RAPD 检测分析的结果有一定的相关性,丽江山慈菇鳞茎秋水仙碱含量可作为其遗传变异的一个重要性状,RAPD 分析结果可为遗传选育高含量单株、高含量居群以及杂交选育工作的开展提供分子层次的理论依据。

利用 DNA 片段多态性分子标记技术,开展丽江山慈菇居群遗传多样性和遗传结构的分析,可为丽江山慈菇的保护、引种驯化、遗传育种、繁育栽培和 GAP 种植提供理论依据。在构建丽江山慈菇 RAPD 指纹图谱的基础上,完善其 DNA 指纹图谱,

对制定丽江山慈菇保护策略和措施以及 GAP 种植标准,有着直接的指导意义。

References:

- [1] Rama T V, Rao P N, Rao R S. Somatic chromosome morphology in the genus *Iphigenia* [J]. *Cytologia*, 1987, 52: 439-444.
- [2] Delectis Florae Reipublicae Populares Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1980.
- [3] Institutum Botanicum Kunmingense Academiae Sinicae Edita. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [4] Dolye J J, Dolye J L. A Rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [5] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, diversity, barbarium, and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
- [6] Hogbi P M, Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata* [J]. *Conserv Biol*, 1999, 13: 514-522.
- [7] Meng Z N, Zhang Z M, Jin X S, et al. Genetic diversity in small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) by RAPD analysis [J]. *Chin Biodiversity* (生物多样性), 2003, 11(3): 197-203.
- [8] He X J, Li B, Yu H. The population study of *Lilium nepalense* [J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 2003, 25: 78-83.
- [9] Gao H X. *Applied Statistical Method and SAS System* (实用统计方法与 SAS 系统) [M]. Beijing: Peking University Press, 2001.

柱色谱-紫外分光光度法测定广金钱草中总黄酮的含量

杨美华, 卢尧伟, 匡岩巍*, 孙仲诒, 吴祖泽

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要:目的 建立广金钱草中总黄酮的含量测定方法。方法 选用测定波长 272 nm, 以 6-C-葡萄糖-8-C-木糖洋芹素 (vicenin-2) 为对照品, 采用柱色谱-紫外分光光度法对不同来源的广金钱草进行了总黄酮的含量测定。结果 vicenin-2 在 10.8~25.2 μg/mL 具有良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 0.0309X + 0.016$ ($r = 0.9999$), 平均回收率为 100.82%, RSD 为 1.30%。结论 该方法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于广金钱草的质量控制。

关键词: 广金钱草; vicenin-2; 总黄酮; 含量测定; 柱色谱-紫外分光光度法

中图分类号: R 282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0688-03

Quantitative determination of total flavonoids in *Desmodium styracifolium* by column chromatogram-UV spectrophotometry

YANG Mei-hua, LU Yan-wei, KUANG Yan-wei, SUN Zhong-yi, WU Zu-ze

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Key words: *Desmodium styracifolium* (O sbeck) Merr.; vicenin-2; total flavonoids; quantitative determination; column chromatogram-UV spectrophotometry

广金钱草为常用中药, 来源于豆科山蚂蝗属植物金钱草 *Desmodium styracifolium* (O sbeck)

Merr. 的干燥地上部分, 收载于《中华人民共和国药典》2000 年版一部^[1]。具有清热除湿, 利尿通淋之功

* 收稿日期: 2003-09-15

作者简介: 杨美华(1964—), 女, 博士, 研究方向为生药分子鉴定、生药分析及新药研究开发。Tel: (010) 62899730 (O)

E-mail: yangmeihua15@hotmail.com

* 河南中医学院 中药系 97 级毕业生