

云南青阳参遗传多样性的 AFLP 研究

王 斌, 王德斌, 翟书华, 岑晓江, 郭 庆, 王定康*

昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650031

摘要:目的 探讨云南青阳参居群内、居群间和种子间的遗传多样性。方法 利用 AFLP 分子标记技术检测云南不同生态环境中青阳参居群内、居群间及不同植株间和同一植株不同双生蓇葖果的不同种子间遗传多样性。结果 居群内遗传多样性比居群间遗传多样性丰富, 居群间有效基因等位数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (H)、Shannon's 指数 (I) 分别为 1.172、0.105、0.161, 居群内最高为 1.217、0.121、0.177; 种子之间遗传多样性 H 值为 0.095, I 值为 0.145) 高于双生蓇葖果间 (H 值为 0.121, I 值为 0.182)。结论 云南青阳参遗传多样性较低, 需要进行保护; 在云南 3 个生态环境中, 楚雄的青阳参遗传多样性较其他地区丰富, AFLP 图谱中也出现与该生态环境相一致的特异条带。

关键词: 青阳参; 遗传多样性; AFLP 分子标记; 不同生态环境; 特异条带

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0985-06

Study on genetic diversity of *Cynanchum otophyllum* in Yunnan by AFLP

WANG Bin, WANG De-bin, ZHAI Shu-hua, CEN Xiao-jiang, GUO Qing, WANG Ding-kang

Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming 650031, China

Abstract: Objective To approach genetic diversity of *Cynanchum otophyllum* among populations, within population and seeds.

Methods AFLP molecular markers were used to analyze the genetic diversity among populations in different ecological environments, different plants, and different seeds of twins follicles. **Results** The results showed that the genetic diversity within population was more abundant than that among populations. The effective number of alleles (N_e), Nei's (1973) gene diversity (H) and Shannon's Information index (I) were 1.172, 0.105, and 0.161 within population, and 1.217, 0.121, and 0.177 among populations. The seeds level had lower genetic diversity than twins' follicles level, their H and I were 0.095, 0.145 and 0.121, 0.182, separately.

Conclusion The genetic diversity of *C. otophyllum* in Yunnan is so lower that the protection is needed. Otherwise, in the three ecological environments discussed in Yunnan, *C. otophyllum* in the Chuxiong ecological environment has richer diversity than those in other regions. According to the AFLP map, a specific band consistent with Chuxiong ecological environment has been found.

Key words: *Cynanchum otophyllum* Schneid; genetic diversity; AFLP molecular marker; different ecological environments; specific bands

青阳参 *Cynanchum otophyllum* Schneid 隶属萝科 (Asclepiadaceae) 鹅绒藤属 (*Cynanchum* L.), 为我国特有的一种药用植物。其具有祛风除湿、解毒镇痉、补气益肾、强筋壮骨、活血散瘀、祛痰止咳、解狂犬毒等功效^[1], 主要分布于湖南、广西、云南、西藏, 是云南省彝族、白族、纳西族等少数民族的常用草药, 为“青阳参片”和“排毒养颜胶囊”的主要原料。青阳参民间用作滋补强壮以及腰痛、风湿骨痛、小儿惊风症、头晕、耳鸣、心慌、毒蛇咬伤等疾病的治疗, 还可用于癫痫病、脑震荡

后遗症、美尼尔氏综合症等的治疗^[2]。野生青阳参由于生长环境条件差异较大, 遗传基础多样, 其品质和成分差异较大^[3]。由于野生药材来源的不足, 青阳参的人工繁育一直是人们关心的问题, 然而, 关于青阳参的传粉机制仍不明确。王定康等^[4]在观察了青阳参的虫媒授粉过程后, 推测青阳参的双生蓇葖果可能由分别接受了不同来源花粉的花房发育而来。因此, 需要从多层次开展野生青阳参的遗传多样性研究。以此作为青阳参保护、道地药材确立的基础依据^[5]。

收稿日期: 2010-09-13

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (209115); 云南省应用基础研究计划项目 (2007C262M); 云南省教育厅科研基金重点项目 (07Z10351)

作者简介: 王 斌 (1976—) 男, 云南昆明人, 讲师, 硕士, 研究方向为分子生物学与生物技术。E-mail: wangbbiomed@126.com

*通讯作者 王定康 E-mail: wdk117@163.com

AFLP (amplify fragment length polymorphic, 扩增片段长度多态性) 分子标记技术具有限制性片段长度多态性 (RFLP) 的高重复性与 PCR 的高效性, 已广泛应用于遗传多样性分析、居群遗传结构分析、系统分类和进化等方面研究^[6-10], 本实验以青阳参为材料, 对不同来源地的不同居群、不同植株的双生果和同一植株的双生果进行 AFLP 分析, 对其遗传多样性和双生果的父本来源进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

挑选了 45 个青阳参植株样品, 分别来自云南昆明、宣威和楚雄, 分为 4 组进行测试。选取不同产地的不同植株, 两个蓇葖果分为第 1 组 (表 1); 在同一植株 (CX3) 中取 5 份不同双生果的种子为第 2 组 (含双生果 CX3-1 和 CX3-2 的种子萌发植株) 和第 3 组 (含双生果 CX3-3 和 CX3-4 的种子萌发植株)。其中 CX3-1 和 CX3-2 属一个双生蓇葖果, CX3-1 含 CX3-1a、CX3-1b、CX3-1c、CX3-1d、CX3-1e 5 个种子; CX3-2 含 CX3-2a、CX3-2b、CX3-2c、CX3-2d、CX3-2e 5 个种子; CX3-3 和 CX3-4 属一个双生蓇葖果, CX3-3 含 CX3-3-a、CX3-3-b、CX3-3c、CX3-3d、CX3-3e 5 个种子; CX3-4 含 CX3-4a、CX3-4b、CX3-4c、CX3-4d、CX3-4e 5 个种子。按地理居群的不同划分为第 4 组 (表 2)。每一组植株样品在同一块聚丙烯酰胺凝胶上电泳。将

收集到的植株及果实的种子分别播种在花盆中, 每盆播种一个果实的所有种子, 待萌发植株长至约 30 cm 时, 取其叶片于 -80 °C 冰箱中贮藏备用。种子在有光条件下层积 1 周后转移到 25~15 °C 的黑暗条件下萌发, 在黑暗环境中层积 2~3 周后转入 30~20 °C 和 25~15 °C 进行变温处理^[4]。

PTC-200 PCR 仪、Eppendorf 5415D 离心机、Bio-Rad Power/PAC300 电泳系统、BioImaging UVP 紫外凝胶成像系统。用 ABI 3730x1 测序仪 (北京三博远志公司) 完成测序。

AFLP 引物及接头均由上海生物工程有限公司合成; 化学试剂由博大泰克生物基因技术有限责任公司提供; Mse I、ECOR I (10 U/μL); T4 DNA Ligase (30 U/μL)。

表 1 不同生态环境不同植株的双生蓇葖果
Table 1 Twins follicles of different plants from various environments

母本株型	蓇葖果 1 萌发株	蓇葖果 2 萌发株
CXa	a11	a12
CXb	b11	b12
CXb	b21	缺
CXc	c11	c12
CXc	c21	c22
CXd	d11	d12
XWx	x11	x12

表 2 不同生态环境的青阳参植株

Table 2 Plants of *C. otophyllum* from various ecological environments

植株编号	采集地	生态类型	经纬度	果实播种地点
XWY	宣威杨梅山	低海拔短日照	104°09'E, 26°11'N	昆明学院
XWH1	宣威小河边	低海拔短日照	104°09'E, 26°11'N	昆明学院
XWH2	宣威小河边	低海拔短日照	104°09'E, 26°11'N	昆明学院
XWD	宣威大落洞	低海拔短日照	104°09'E, 26°11'N	昆明学院
XWL	宣威大梁子	低海拔短日照	104°09'E, 26°11'N	昆明学院
KM1	昆明黑龙潭	高海拔长日照	102°75'E, 26°02'N	昆明学院
KM2	昆明石林	高海拔长日照	103°40'E, 24°23'N	昆明学院
KM3	昆明明朗水库	高海拔长日照	102°65'E, 24°43'N	昆明学院
CX1	楚雄武定	高海拔长日照	102°45'E, 25°58'N	楚雄农业学校
CX2	楚雄元谋	高海拔长日照	101°54'E, 25°01'N	楚雄农业学校
CX3	楚雄南华	高海拔长日照	101°26'E, 25°21'N	楚雄农业学校
CX4	楚雄姚安	高海拔长日照	101°24'E, 25°4'N	楚雄农业学校

1.2 AFLP 分析

1.2.1 酶切连接体系 参照 Shasany 等^[6]的方法; AFLP 反应体系及银染参考文献方法^[11-13]。

1.2.2 选择性扩增引物组合 经 8 个 EcoRI 引物和

8 个 MseI 引物组成的 64 对引物组合筛选后, 挑选出选择性扩增引物组合为 E-ACC/M-CAA (E5M1)、E-ACG/M-CTT (E6M8)、E-AGG/M-CTA (E7M3) (表 3)。

表 3 3 对选择性扩增引物组合

Table 3 Three pairs of AFLP selective amplification primer sequences

引物	ECORI 酶切端口	MseI 酶切端口
E5M1	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CAA
E6M8	GACTGCGTACCAATTC ACG	GATGAGTCCTGAGTAA CTT
E7M3	GACTGCGTACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGAGTAA CTA

1.3 数据分析

AFLP 带为显性标记, 按照扩增条带的有无分别记为“1”和“0”。其结果为一个二元矩阵, 将其输入 POPGENE1.32 软件处理分析, 计算其多态性位点数 (PPL)、多态性位点比率 (PPB)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 多样性指数 (I), 相似性大于 90% 归为一个遗传谱系^[14]。采用 MEGA4.1 软件进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 不同抽样类群的遗传多样性分析

通过 3 对引物分 4 组对 45 个样品扩增后, 分析遗传多样性。第 1 组检测不同植株上各 2 个萵苣果萌发植株, 共扩增到 125 个位点, PPL 为 44 个, PPB 为 28.76%, N_e 值为 1.207, H 值为 0.121, I 值为 0.182; 第 2、3 组 4 个萵苣果 20 粒种子萌发株, 共扩增到 126 个位点, PPL 为 35 个, PPB 值为 22.88%; 第 4 组样品共扩增到 98 个位点, PPL 为 38 个, PPB 值为 24.84% (图 1, 表 4)。从 4 组结果来看, 所采集的青阳参样本主要分布于云南 3 个地区, 其中楚雄为主要药材产地, 青阳参 N_e 值、 H 值、 I 值分别位于 1.164~1.207、0.095~1.121、0.141~0.182, 表明上述 3 个采样点青阳参遗传多样性较低。

2.1.1 不同植株双生果实遗传关系 通过对第 1 组 AFLP 结果的遗传距离和遗传相似性分析 (表 5) 和 UPGMA 聚类图 (图 2), 可以看出, 所用材料聚为 3 个类群, 其中, 第 1 个类群和第 2 个类群之间遗传距离为 0.091, 区别不是很明显, 第 2 个类群和第 3 个类群之间遗传距离为 0.123, 表明 2、3 类群遗传距离部分大于 0.1, 差异显著。但从果实之间的遗传距离来看, 同一植株上的双生果之间均小于 0.1。表明同一植株果实来源于不同父本的可能性较小。

2.1.2 相同植株不同双生果间的遗传背景分析 第 2、3 组实验材料来源于同一植株双生萵苣果的 20 粒种子萌发植株, 由聚类拓扑 (图 3) 可以看出, 同一植株的双生果之间存在遗传差异, 但没有按萵

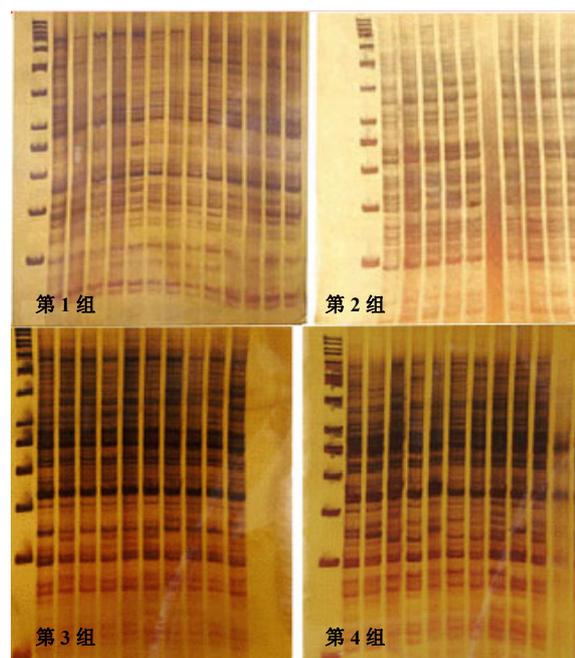


图 1 AFLP 扩增图谱

Fig. 1 AFLP amplification maps

苣果进行严格聚类, 表明萵苣果种子之间遗传距离较小, 难以区分开, 推测来源不同父本的可能性较小。另外, 每一个萵苣果来源的种子 (表 4) 间遗传多样性均显著低于不同植株间, 进一步表明同一植株上各个萵苣果来源于不同花粉的可能性较小。

2.1.3 不同地理居群的遗传多样性 第 4 组材料来自宣威、昆明、楚雄等 3 个不同生态环境, 分别代表较低海拔、较短日照、红壤、紫色土、冲积土、水稻土为主的滇东北 (宣威) 生态类型; 以较高海拔、较长日照, 以红壤为主的滇中生态类型和以更高海拔、更长日照、以紫棕色和砂壤土为主的滇西北生态类型。聚类结果获得两个明显的类群 (图 4), 昆明和宣威聚为一类, 位于昆明、楚雄交界的 KM3 采样点与楚雄划为同一居群。居群间遗传多样性 N_e 为 1.172、 H 为 0.105、 I 为 0.161; 对于楚雄居群的多样性, 在第 1 组和第 4 组分析中出现了不同的结果, 见表 6, 第 1 组中采样数为 11 个, 第 4 组采样数为 4 个, 第 1 组 N_e 、 H 、 I 值分别为 1.217、0.121、

表 4 所选样品按类群的 AFLP 分析结果

Table 4 Genetic variation for all populations by AFLP analysis

不同居群抽样		N_e	H	I	PPL/个	PPB/%
第 1 组	双生果 1	1.188	0.105	0.154	33	21.57
	双生果 2	1.214	0.121	0.178	39	25.49
	双生果间	1.207	0.121	0.182	44	28.76
第 2 组	CX3-1	1.089	0.050	0.073	16	10.46
	CX3-2	1.106	0.060	0.087	19	12.42
第 3 组	CX3-3	1.083	0.050	0.076	15	9.8
	CX3-4	1.079	0.042	0.059	9	5.88
	种子间	1.164	0.095	0.141	35	22.88
第 4 组	宣威居群	1.161	0.089	0.129	25	16.43
	昆明居群	1.091	0.053	0.078	16	10.46
	楚雄居群	1.080	0.046	0.069	15	9.8
	居群间	1.172	0.105	0.161	38	24.84

表 5 第 1 组样品遗传相似性和遗传距离

Table 5 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of group one

	a11	a12	b11	b12	b21	c11	c12	c21	c22	d11	d12	x11	x12
a11		0.063	0.044	0.029	0.089	0.069	0.067	0.086	0.094	0.102	0.099	0.095	0.124
a12	0.937		0.058	0.131	0.104	0.111	0.101	0.110	0.137	0.128	0.124	0.110	0.130
b11	0.957	0.942		0.053	0.065	0.064	0.052	0.071	0.089	0.097	0.094	0.079	0.099
b12	0.971	0.869	0.947		0.061	0.078	0.057	0.086	0.094	0.102	0.109	0.085	0.114
b21	0.911	0.896	0.935	0.939		0.054	0.060	0.069	0.087	0.113	0.110	0.087	0.106
c11	0.931	0.889	0.936	0.922	0.946		0.059	0.050	0.076	0.093	0.099	0.113	0.113
c12	0.933	0.900	0.948	0.943	0.940	0.941		0.056	0.074	0.053	0.049	0.093	0.122
c21	0.914	0.890	0.929	0.914	0.931	0.950	0.944		0.028	0.053	0.078	0.083	0.093
c22	0.906	0.863	0.911	0.906	0.913	0.924	0.926	0.972		0.052	0.096	0.073	0.082
d11	0.898	0.873	0.903	0.898	0.887	0.907	0.947	0.947	0.948		0.055	0.060	0.090
d12	0.901	0.876	0.906	0.891	0.890	0.901	0.952	0.922	0.904	0.945		0.036	0.076
x11	0.906	0.890	0.921	0.915	0.914	0.887	0.907	0.917	0.928	0.940	0.965		0.066
x12	0.876	0.870	0.901	0.886	0.894	0.887	0.878	0.907	0.918	0.910	0.924	0.934	

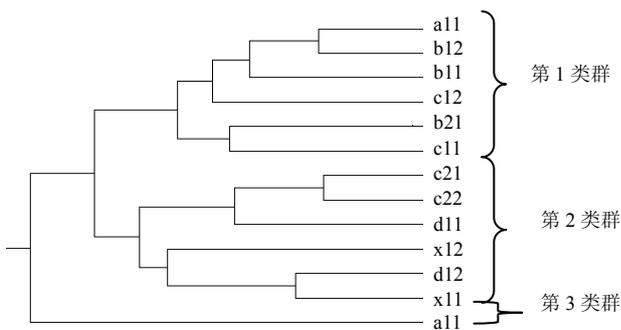


图 2 UPGMA 法构建不同植株双生果的拓扑图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for twins follicles of different plants

0.177; 第 4 组检测结果则极低, 为 1.080、0.046 和 0.069。从取样数来看, 第 1 组结果更可信。

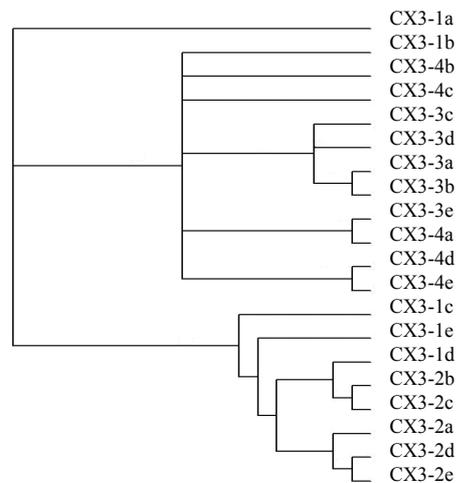


图 3 第 2、3 组材料合并后的进化树拓扑图

Fig. 3 Phylogenetic tree of integrated second and third groups

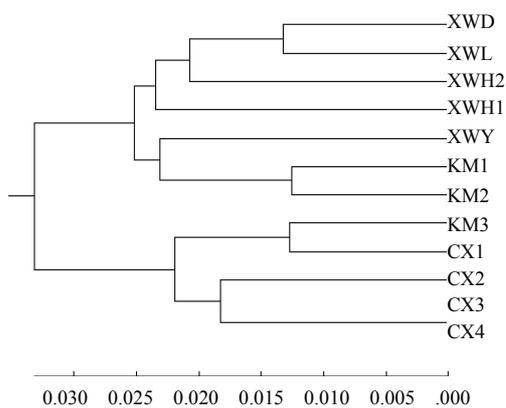


图 4 UPGMA 法构建的不同地理居群的系统图谱
Fig. 4 UPGMA dendrogram for various populations

表 6 楚雄居群青阳参遗传多样性

Table 6 Genetic diversity of Chuxiong populations

居群	N_e	H	I	PPL/个	PPB/%
第 1 组中楚雄居群	1.217	0.121	0.177	39	25.49
第 4 组中楚雄居群	1.080	0.046	0.069	15	9.8

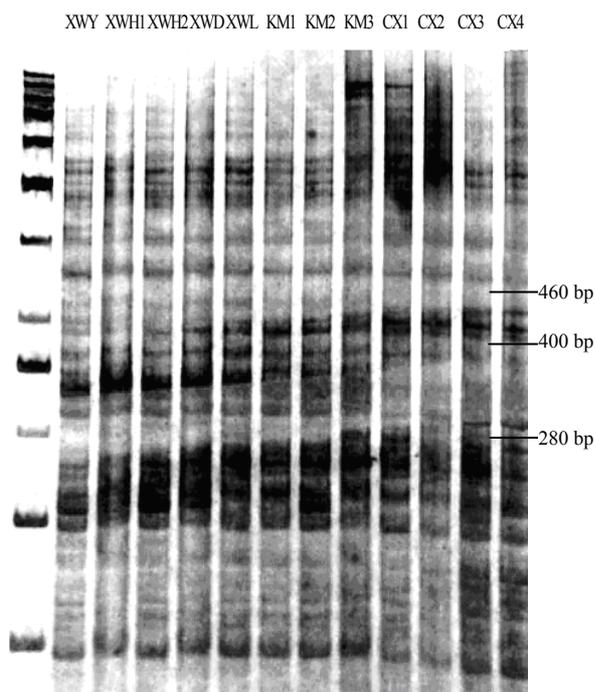


图 5 E7M3 引物组合的扩增多态性及 SCAR 标记片段
Fig. 5 Polymorphism and SCAR fragment of AFLP bands obtained by selective amplification using primer pair E7M3

利用 AFLP 方法，对青阳参不同生态环境，不同植株不同双生蓇葖果的遗传多样性分析，结果表明双生蓇葖果的遗传多样性小于植株水平。对同一

2.2 与产地一致的分子标记

比较 12 个不同地区（表 2）青阳参材料的 3 对引物的 AFLP 扩增图谱（图 5，引物为 E7M3），发现第 4 组 AFLP 图谱中多处存在只有 KM3、CX1、CX2、CX3、CX4 等样品才出现的特异性条带，这可能与这些样品正好与楚雄产地相近的生态环境有关，KM3 产地昆明明朗水库与楚雄接壤，生态环境相近。E7M3 引物对 AFLP 图谱中存在 460、400、280 bp 等多处特异性条带，对其中 460 bp 条带回收并测序，得到与产地有关的候选分子标记。

3 讨论

3.1 双生蓇葖果及种子之间遗传背景

植株不同双生蓇葖果遗传多样性分析表明，种子水平的遗传多样性远小于双生果之间，且聚类分析表明，来自同一植株不同的双生蓇葖果间的种子萌发株，并没有按双生蓇葖果的不同聚为不同的类群。综合这些结果分析，同一植株青阳参双生蓇葖果来自接受了不同花粉的花房的推测没有分子依据。即同一植株不同果实父本来源的不同的假设不成立。

3.2 青阳参不同层次遗传多样性

对青阳参居群间、居群内及植株间、种子间遗传多样性分析表明，居群间遗传多样性 N_e 为 1.172、 H 为 0.105、 I 为 0.161；居群内遗传多样性最高为楚雄居群， N_e 、 H 、 I 值为 1.217、0.121、0.177；种子间遗传多样性 N_e 为 1.164、 H 为 0.095、 I 为 0.145。居群内遗传多样性高于居群间，居群间高于同一母本种子萌发株水平。与 RAPD^[11] 的研究结果一致，青阳参中居群内多样性大于居群间多样性，推测生态环境差异导致的变异低于居群内变异；同一植株内不同种子聚类分析的进化树拓扑图与居群内相似，同样分成 3 个分支，与 RAPD^[15] 结果一致，表明遗传变异更多来自种子间。

居群间遗传多样性表明，虽然云南独特的生态多样性导致了地理隔离，但是青阳参遗传多样性较低。来自云南宣威、昆明和楚雄 3 个地理居群中，楚雄居群遗传多样性较高。总体来说青阳参作为一种天然药物，其遗传资源基础较狭窄。

3.3 遗传多样性与分子标记

杨竹雅等^[15]进行的青阳参 RAPD 的遗传多样性研究中, 比较了云南丽江、下关、洱源、楚雄等地青阳参材料, 发现楚雄长日照和高海拔、四季温差变化不大, 青阳参的居群遗传多样性最丰富, 且楚雄居群及丽江居群与其他产地分别聚为不同的类群。AFLP 分析结果表明, 楚雄居群遗传多样性最丰富, 且有许多特异性条带。通过回收测序, 成功地获得一条代表楚雄居群的特异性序列, 可作为楚雄居群的分子标记。

居群间的聚类分析将楚雄青阳参(其中, KM3 产地与楚雄接壤, 生态环境一致)与其他地区居群明显分开, 进一步表明楚雄生态环境对青阳参的独特意义。不同居群青阳参在青阳参苷、多糖硫酸酯^[16]等主要药用成分方面是否存在质的区别, 尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 罗天浩. 森林药物资源学 [M]. 北京: 国际文化出版公司, 1994.
- [2] Li Q Z. The study on the planting technology of *Cynanchum otophyllum* Schneid [D]. 昆明: 云南农业大学, 2005.
- [3] 黄璐琦. 分子生药学 [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2006.
- [4] Wang D K, Sun G F, Zhai S H, et al. Seeds germination of *Cynanchum otophyllum* (Asclepiadaceae) endemic to China [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2009, 31(2): 173-177.
- [5] 黄璐琦, 郭兰萍, 华国栋. 道地药材属性及研究对策 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(2): 44.
- [6] Shasany A K, Darokar M P, Dhawan S, et al. Use of RAPD and AFLP markers to identify inter- and intraspecific hybrids of *Mentha* [J]. *J Hered*, 2005, 96(5): 542-549.
- [7] 黄想安, 董美芳, 阎学燕, 等. 石蒜属种间亲缘关系 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 148-152.
- [8] 黄庆阳, 樊锐锋, 常 纓. 香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 971-974.
- [9] 王 喆, 张 铮, 褚会娟, 等. 三叶木通 AFLP 反应体系的建立及优化 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2074-2078.
- [10] 赵良贵, 南晓洁, 郝媛媛, 等. 柴胡栽培种的 RAPD 和 AFLP 遗传关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 113-117.
- [11] Leal-Klevezas D S, Martínez-de-la-Vega O, Ramírez-Barba E J, et al. Genotyping of *Ochrobactrum* spp. by AFLP analysis [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(7): 2537-5379.
- [12] Savelkoul P H M, Aarts H J M, De Haas J, et al. Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10): 3089-3091.
- [13] 王定康, 王 斌, 李树辉. 青阳参叶片 DNA 的提取与 AFLP 反应体系的建立 [J]. 江苏农业科学, 2008(3): 70-72.
- [14] Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics [J]. *Ann Rev Genet*, 1996, 30: 371-403.
- [15] 杨竹雅, 普春霞, 钱子刚, 等. 青阳参及其近缘种的 RAPD 研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(7): 562-566.
- [16] 姜海鸥, 黄雪霜, 王 斌, 等. 青羊参多糖硫酸酯体外抗单纯疱疹病毒 II 型活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 674-675.