

我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析

李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 李泉森

重庆市中药研究院中药种植研究所, 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065

摘要: 目的 从分子水平研究我国仙茅属 (*Curculigo* Gaertn.) 植物的遗传关系。方法 对我国仙茅属植物 7 个国产种 30 个单株进行 RAPD 分析。运用 Popgene Version 1.31 软件计算相关参数, 采用 UPGMA 聚类法进行聚类分析。结果 11 个 RAPD 引物共扩增出 157 条带, 其中有 145 条呈多态性。我国仙茅属植物的遗传多样性极为丰富, 在物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 92.36%, 平均每个位点的有效等位基因数 (N_e) 为 1.493 7, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.300 1, Shannon's 多样性信息指数 H_{sp} 为 0.457 7。在种内水平上, PPB=5.09%, N_e =1.036 6, H =0.020 4, 种内 Shannon's 多样性信息指数 (H_{pop}) 为 0.029 8。Nei's 基因多样性指数计算的种间遗传分化系数 (G_{st} =0.931 3) 与 Shannon's 分化系数 (0.934 9) 基本一致, 均说明大部分遗传变异存在于种间。种间基因流 (N_m) 为 0.036 9, 说明种间基因流动较少, 遗传分化程度较高。两种间的 Nei's 遗传一致度 (I) 的范围为 0.520 8~0.823 7。根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类, 基于 RAPD 分子标记的聚类结果与传统分类一致。结论 我国仙茅属植物的遗传多样性十分丰富, 且种间的遗传差异大于种内的遗传差异。

关键词: 仙茅属; 随机扩增多态性 DNA; 遗传多样性; 聚类分析; 多态性条带

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0980-05

Analysis on genetic relationship of plants in *Curculigo* Gaertn. from China by RAPD

LI Long-yun, CHEN Da-xia, ZHONG Guo-yue, LI Quan-sen

Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Institute of Chinese Materia Medica Planting, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: **Objective** The genetic relationship of plants in *Curculigo* Gaertn. was analyzed in molecular level. **Methods** Thirty individuals of seven species in *Curculigo* Gaertn. were employed to be analyzed by the approach of random amplified polymorphic DNA (RAPD). The parameters were calculated by Popgene Version 1.31 and the relationship was constructed based on UPGMA method. **Results** Eleven primers screened out from 40 primers were used for RAPD amplification. A total of 157 bands were generated, of which 145 bands were polymorphism bands. The result showed that there was a high genetic diversity among the seven species in *Curculigo* Gaertn. At species level: percentage of polymorphic loci PPB was 92.36%, effective number of alleles N_e was 1.493 7, Nei's gene diversity H was 0.300 1, and Shannon's information index H_{sp} was 0.457 7; Within species levels: PPB was 5.09%, N_e was 1.036 6, Nei's gene diversity H was 0.020 4, and Shannon's information index H_{pop} was 0.029 8. The Nei's coefficient of genetic differentiation was 0.931 3, which was consistent with the Shannon's coefficient of genetic differentiation (0.934 9). Most of the genetic variation existed among populations. The gene flow was 0.036 9, which indicated that it was less among the populations and the degree of genetic differentiation was higher. Nei's genetic identity (I) was changed from 0.520 8 to 0.823 7. By clustering analysis, the classified result of RAPD marker was almost same with the traditional modal character. **Conclusion** The genetic diversity of the seven species in *Curculigo* Gaertn. is high. The genetic difference among populations is higher than that within the species.

Key words: *Curculigo* Gaertn.; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity; clustering analysis; polymorphic bands

全世界共有仙茅属 (*Curculigo* Gaertn.) 植物 20 余种, 中国有 7 种, 主产于西南和华南地区^[1]。该属植物被药用的主要有两种, 为仙茅和大叶仙茅,

仙茅属的其余种药用很少, 因此, 基原鉴定是临床用药安全的保证。关于我国仙茅属植物的分类除了依据其花等外部形态特点进行鉴定外, 还可以依据

收稿日期: 2010-11-25

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2001BA701A32, 2004BA604A04); 重庆市科技计划项目 (6455)

作者简介: 李隆云 (1964—), 男, 四川巴县人, 重庆市中药研究院副院长, 研究员, 博士, 长期从事药用植物栽培及分子生物学研究, 国家中医药管理局重点学科中药生药学科带头人。Tel: (023)89029118 E-mail: lilongyun8@163.com

核型特征及花粉、种子的显微特征进行鉴定^[2-4]。随着分子生物学的发展,分子标记技术^[5-6]已应用到仙茅属遗传关系的研究中,为仙茅属物种的分类鉴定提供了更为快捷的方法,但已有的研究未涉及到种内遗传关系及遗传多样性。本研究以我国仙茅属植物 7 个种 30 个个体为对象,采用 RAPD 分子标记技术,分析我国仙茅属植物种间及种内的遗传多样性及遗传关系,为资源的可持续利用提供理论依据。

1 材料和方法

表 1 实验材料

Table 1 List of materials used

序号	材料名称	拉丁学名	组别	来源	取样个体编号
1	绒叶仙茅	<i>C. crassifolia</i>	大叶仙茅组	云南文山	1~3
2	中华仙茅	<i>C. sinensis</i>	大叶仙茅组	云南金平	4~7
3	短葶仙茅	<i>C. breviscapa</i>	大叶仙茅组	广西扶绥	8~11
4	疏花仙茅	<i>C. gracilis</i>	大叶仙茅组	重庆南川	12~16
5	大叶仙茅	<i>C. capitulata</i>	大叶仙茅组	重庆南山	17~21
6	光叶仙茅	<i>C. glabrescens</i>	仙茅组	海南保亭	22~25
7	仙茅	<i>C. orchioides</i>	仙茅组	四川宜宾	26~30

1.2 基因组 DNA 的提取

将仙茅属植物的 7 个种,共 30 个个体采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 Smart SpeeTM3000 型分光光度计(Bio-Rad 公司)测定其质量浓度和质量分数。将每个个体的基因组 DNA 质量浓度稀释为 40 ng/ μ L。

1.3 RAPD-PCR 扩增与产物检测

RAPD 引物购买于北京赛百盛基因有限公司,dNTP 和 Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。RAPD 反应体系参照文献方法进行^[7],即 25 μ L 体系中含 1 $\times$ PCR buffer、2 mmol/L Mg^{2+} 、200 μ mol/L dNTP、20 ng 引物、40 ng 模板、1 U Taq 酶。

PCR 扩增在 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Model No.TP600 扩增仪(宝生物工程有限公司)上进行。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,40 循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,39 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 扩增产物与 2 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混匀,在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离,电压不超过 5 V/cm。当溴酚蓝指示剂距离琼脂糖凝胶前沿 2~3 cm 时停止电泳,用 0.5 μ g/mL EB 染色 15~30 min 后,在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)上检测、照相、记录。

1.1 材料

仙茅属植物 7 个国产种(表 1)于 2002 年 4 月至 2003 年 12 月采自四川、重庆、云南、广西、海南,种植于重庆市中药研究院药用植物标本园。由重庆中药研究院生药栽培室秦松云副研究员、李泉森副研究员及成都中医药大学卫莹芳教授进行物种鉴定。在成熟植株上选择当年萌发的幼嫩叶片,低温下带回实验室,洗净晾干后,用于基因组 DNA 的提取。

1.4 数据的采集、统计

根据各分子标记的迁移率统计所有的二元数据,按条带有或无赋值,有带(显性)记为“1”,无带(隐性)记为“0”,强带和弱带的赋值均为 1,以此作为数据记录的标准。对于多态性位点,在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析。

单个个体分析采用 Treeconw 软件,版本为 1.3。采用非加权配对组算术平均法(unweighted pair group method using arithmetic average,UPGMA)建立系统聚类分支树状图。同时运用 Popgene Version1.31 软件计算 7 个种总基因多样性(the whole genetic diversity, H_t)、种内基因多样性(gene diversity within population, H_{sp})、种间基因多样性(genetic diversity among populations, D_{st})、遗传分化系数(genetic differentiation, G_{st})、基因流(the gene flow, N_m)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity, H)、Shannon's 多样性信息指数(Shannon information index, H_o)、Nei's 遗传一致度(Nei's genetic identity, I)和遗传距离(genetic distance, D)。

2 结果与分析

2.1 RAPD 遗传多态性分析

本研究从 20 个 RAPD 引物中筛选出谱带清晰并呈现多态性的 11 个引物,对供试材料进行

RAPD-PCR 扩增,图 1 为引物 SBSH02 的扩增图谱。11 个引物扩增的总带数及多态性条带数见表 2。

RAPD 反应扩增片段大部分集中在 200~2 000 bp。11 个引物共扩增出 157 条可区分的 DNA 条带,每个引物检测到的位点在 3~22, 平均每个引物可

扩增出 14.3 条带。这 157 条 DNA 扩增条中,有 145 条带呈多态性, 占所观察到的总扩增带的 92.36%, 每个引物可扩增出 2~21 条多态性带, 平均每个引物产生 13.5 条多态性带。以上 RAPD 数据分析表明, 仙茅属 7 个种的多态性极为丰富。

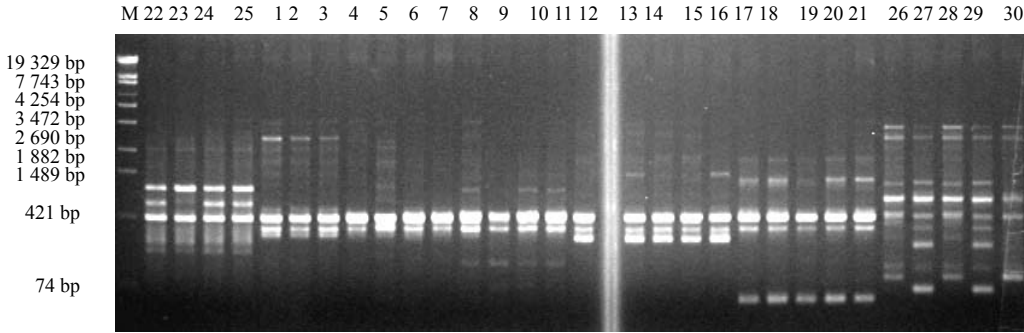


图 1 引物 SBSH02 的扩增结果
Fig. 1 Amplification of primer SBSH02

表 2 11 个引物的序列及扩增结果

Table 2 Sequence and amplification of 11 primers

引物名	序 列	总带数	多态性带数	引物名	序 列	总带数	多态性带数
SBSH02	TCGGACGTGA	14	13	SBSJ06	TCGTTCCGCA	14	14
SBSH04	GGAAGTCGCC	14	12	SBSJ07	CCTCTCGACA	12	12
SBSH07	CTGCATCGTG	15	15	SBSJ13	CCACACTACC	22	21
SBSH11	CTTCCGCAGT	3	2	SBSJ14	CACCCGGATG	18	17
SBSJ04	CCGAACACGG	18	16	SBSJ17	ACGCCAGTTC	21	18
SBSJ05	CTCCATGGGG	6	5	总计		157	145

2.2 遗传多样性分析

Popgene 软件分析表明, 仙茅属植物 7 个种间的遗传多样性非常丰富, 种内遗传多样性极低, 结果见表 3。在物种水平上, 多态位点百分比(PPB)为 92.36%、平均每个位点的有效等位基因数(N_e)为 1.493 7、 H 为 0.300 1 和 H_{sp} 为 0.457 7, 结果表明仙茅属植物 7 个国产种种间的遗传多样性非常丰富。在种内水平上, N_e 为 1.005 5~1.063 9, 平均为 1.036 6; Nei's 基因多样性指数反映了基因的多样性和基因的分化程度, 用 H 估算的种内遗传多样性偏低, 变化幅度在 0.003 8~0.034 6, 平均为 0.020 4; 用 Shannon's 多样性信息指数(H_{pop})估算种内遗传多样性, 变化幅度在 0.006 1~0.050 0, 平均为 0.029 8。以上 3 个指数估算的种内平均遗传多样性的高低顺序与 PPB (1.27%~8.28%, 平均值为 5.09%) 变化规律基本一致: 光叶仙茅>仙茅>中华仙茅>疏花仙茅>短萼仙茅>大叶仙茅>绒叶仙茅。

2.3 仙茅属植物 7 个种的遗传变异

用 Popgene 计算出的遗传变异分析结果表明: 种间存在着一定的遗传分化。在假设遗传平衡条件下计算出 7 个种 H_t 为 0.297 5, H_s 为 0.020 4, 种间的基因多样性($D_{st}=H_t-H_s$)为 0.277 1, G_{st} 为 0.931 3, 表明有 93.13%的遗传变异存在于种间, 6.87%的遗传变异存在于种内, 以上数据表明种间具有极高的遗传多样性, 远大于种内的遗传多样性。基因流 [$N_m=0.5(1-G_{st})/G_{st}$] 为 0.036 9, 表明种间基因交流处于极低等水平, 交流极少。根据 Shannon's 多样性信息指数的分析结果(物种水平上 $H_{sp}=0.457 7$, 种内水平上 $H_{pop}=0.029 8$), 计算出 Shannon's 种间分化系数 $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 为 0.934 9, 即有 93.49%的遗传变异分布在种间, 6.51%的遗传变异分布在种内。

以上 2 种方法的分析结果基本一致, 仅存在微小的差异。两者共同表明仙茅属植物种间的遗传分

表 3 仙茅属植物 7 个种的遗传多样性分析
Table 3 Genetic diversity of seven species in *Curculigo* Gaertn. from China

种	<i>n</i>	<i>K</i>	PPB/%	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H</i>	<i>H_o</i>
1	3	2	1.27	1.012 7 (0.112 5)	1.005 5 (0.048 1)	0.003 8 (0.033 7)	0.006 1 (0.053 6)
2	4	10	6.37	1.063 7 (0.245 0)	1.042 2 (0.180 6)	0.023 9 (0.097 0)	0.035 4 (0.140 4)
3	4	6	3.82	1.038 2 (0.192 3)	1.036 4 (0.184 2)	0.018 6 (0.093 6)	0.025 9 (0.130 6)
4	5	7	4.46	1.044 6 (0.207 1)	1.033 1 (0.158 4)	0.018 7 (0.087 8)	0.027 1 (0.126 8)
5	5	5	3.18	1.031 8 (0.176 2)	1.021 0 (0.131 7)	0.011 7 (0.069 6)	0.017 2 (0.100 0)
6	4	13	8.28	1.082 8 (0.276 5)	1.063 9 (0.228 3)	0.034 6 (0.119 8)	0.050 0 (0.170 5)
7	5	13	8.28	1.082 8 (0.276 5)	1.053 8 (0.189 3)	0.031 8 (0.108 6)	0.047 1 (0.159 4)
平均		8	5.09	1.050 9 (0.212 3)	1.036 6 (0.160 1)	0.020 4 (0.087 2)	0.029 8 (0.125 9)
物种水平	30	145	92.36	1.923 6 (0.266 5)	1.493 7 (0.309 3)	0.300 1 (0.150 7)	0.457 7 (0.199 3)

n-样本数量, *K*-多态位点数, PPB-多态位点百分数, *N_a*-观察到的等位基因数, *N_e*-有效等位基因数, *H*-Nei's 基因多样性指数, *H_o*-Shannon's 多样性信息指数。括号内数据为标准误差

N-sample size, *K*-No.of polymorphic loci, PPB-percentage of polymorphic loci, *N_a*-Observed number of alleles, *N_e*-effective number of alleles, *H*-Nei's gene diversity, *H_o*-Shannon's information index

化明显, 遗传变异主要存在于种间。

2.4 种间遗传距离和遗传一致度

遗传一致度和遗传距离分别是相同和相反 2 个方面度量种间遗传关系的指标, 遗传距离反映种间亲缘关系的远近。用 Popgene 计算出了仙

茅属植物 7 个种间的 Nei's 遗传一致度和遗传距离。从表 4 可以看出, 两种间的 *I* 在 0.520 8~0.823 7。疏花仙茅和大叶仙茅之间的遗传距离最小 (0.194 0), 疏花仙茅与仙茅之间的遗传距离较大 (0.652 3)。

表 4 仙茅属植物 7 个种种间的遗传一致度和遗传距离
Table 4 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among seven species in *Curculigo* Gaertn. from China

种	1	2	3	4	5	6	7
1	—	0.740 4	0.722 5	0.710 7	0.704 6	0.602 8	0.628 0
2	0.305 2	—	0.781 5	0.751 6	0.761 1	0.638 5	0.536 3
3	0.325 0	0.264 9	—	0.739 3	0.725 4	0.671 4	0.598 1
4	0.341 4	0.300 7	0.302 0	—	0.823 7	0.610 5	0.520 8
5	0.350 2	0.284 0	0.321 1	0.194 0	—	0.607 9	0.532 6
6	0.506 2	0.465 6	0.398 4	0.493 5	0.497 7	—	0.661 3
7	0.465 3	0.635 6	0.514 0	0.652 3	0.630 0	0.413 5	—

2.5 仙茅属植物 7 个种聚类分析

用 Treeconw 软件计算供试材料间的遗传相似系数, 按 UPGMA 法进行聚类分析, 建立聚类分支树状图 (图 2)。RAPD 标记可以将仙茅属植物 7 个种完全区别开, 个体均聚在同一种内, 且仙茅属的 2 个组聚类非常明显: 仙茅组中的仙茅与光叶仙茅聚为一类, 大叶仙茅组中的 5 个种聚为一类。其中, 在大叶仙茅组中, 疏花仙茅与大叶仙茅、短葶仙茅与中华仙茅分别聚为一类, 二者再与单独聚为一支的绒叶仙茅聚在一起。以上聚类结果与传统形态学分类结果极为相似。

3 讨论

我国仙茅属植物 7 个种的植物学性状表现出极高的形态多样性, 从植株高矮到花序、花子房顶端喙、叶片质地等都表现出很大变异。李隆云等^[8]采用新型标记 SRAP 研究仙茅属植物 7 个国产种的遗传关系, 多态性比率为 98.6%, 从分子水平揭示 7 个国产种之间存在着极大的遗传差异。本研究采用 RAPD 标记同样证实种间具有丰富的遗传变异, 且大部分的遗传变异产生于种间, 种内的遗传分化处于极低水平。种内遗传多样性极低可能与取样的个体数量有一定关系, 以仙茅最为丰富。

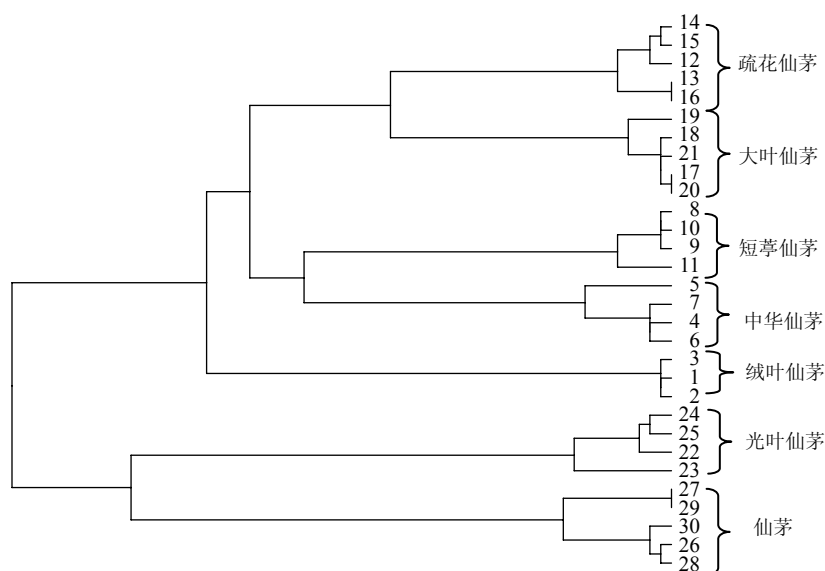


图 2 仙茅属 7 个种 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of seven species in *Curculigo* Gaertn. from China by UPGMA

本研究中 RAPD 标记聚类结果及已有分子生物学研究结果均证实^[8], 仙茅组的仙茅和光叶仙茅的亲源关系最近, 无论采用何种分析方法, 二者均聚为一类, 大叶仙茅组的 5 个种则聚为另一类, 这与传统分类的相似度极高。大叶仙茅组的 5 个种之间采用不同的分类方法, 其聚类先后结果略有差异。这可能与仙茅属植物植株形态的多样性和物种分布有关。从植株外部形态看, 表现最为突出的是植株的高矮, 仙茅组的 2 个种植物均较为矮小, 而大叶仙茅组中的 5 个种, 除疏花仙茅植株相对小一些外, 其余均为高大植株。从物种自然分布看, 绒叶仙茅与中华仙茅分布区重叠, 疏花仙茅、短葶仙茅、绒叶仙茅均在大叶仙茅分布区的一定地区范围分布, 显示仙茅属这 5 个物种间的遗传关系的复杂性。

从研究结果可以看出, 基于 RAPD 分子标记的聚类分析结果与仙茅属经典分类具有很好的相似度, 说明 RAPD 分子标记技术的可靠性和重现性, 可作为仙茅属物种资源的分类和遗传亲缘关系研究的有效方法之一, 能对仙茅属植物物种资源作出客观、真实的结论。同时也从分子水平上证实, 传

统经典分类中将仙茅属植物划分为仙茅组和大叶仙茅组是有科学依据的。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 杨永平, 顾志建, 李 恒, 等. 仙茅属三个国产种的核型研究 [J]. 云南植物研究, 1989, 11(3): 350-354.
- [3] 董国明, 张汉明. 5 种仙茅属植物种子表面显微特征观察 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(1): 6-8.
- [4] 董国明, 张汉明, 郑汉臣. 仙茅属植物花粉的计算机图像分析 [J]. 第二军医大学学报, 1994, 15(3): 233-235.
- [5] 张春平, 何 平, 何俊星, 等. ISSR 分子标记对金荞麦 8 个野生居群的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1519-1522.
- [6] 欧立军, 颜 旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 353-357.
- [7] 陈大霞, 李隆云, 钱 敏, 等. 黄连药材 DNA 的提取及 RAPD 反应体系的优化 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1233-1237.
- [8] 李隆云, 陈大霞, 秦松云, 等. 仙茅属植物七个国产种的 SRAP 遗传关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 117-120.