

药用峨眉野连遗传多样性的 RAPD 分析

张春平¹, 何平^{1*}, 何俊星¹, 张益锋¹, 乔元宝¹, 张敏¹, 石章田¹, 胡世俊²

(1. 西南大学 生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室

重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715;

2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

[摘要] 目的:对峨眉野连进行遗传多样性研究。方法:通过 RAPD 技术对 10 个野生峨眉野连居群共 110 个个体进行遗传多样性分析。结果:用 14 个随机引物共扩增出 132 条清晰条带,其中 98 条具多态性,平均多态性位点比率为 74.24%, Nei '基因多样性指数 $H = 0.2863$, Shannon 's 多样性指数 $I = 0.3624$, 遗传分化指数 $G_{st} = 0.2305$, 遗传距离和遗传一致度分别为 $0.1931 \sim 0.5245$, $0.5016 \sim 0.8843$ 。结论:峨眉野连种水平上具有较高的遗传多样性,遗传变异主要存在于居群内部,遗传多样性与地理关系表现出明显的相关性, RAPD 可以作为研究遗传多样性及遗传分化的有效标记。

[关键词] 峨眉野连; 遗传多样性; RAPD; 聚类分析; 遗传分化

峨眉野连 *Coptis ameiensis* (Chen) C. Y. Cheng 为毛茛科黄连属多年生草本植物,习称“岩连”,为国家二级濒危保护植物^[1],主要分布在四川西部的峨眉、雅安与洪雅等海拔 1 000 ~ 1 700 m 的隐蔽悬岩陡壁上。野连性寒、味苦,具有清热、解毒、泻火、燥湿和良好的抗菌作用。由于其叶片窄长,形似雉尾,故又有“凤尾连”的美称,野连单枝略微弯曲,表面黑褐,断面金黄,比家种黄连色泽更深,味道更苦,质量更优。野连根茎有效成分小檗碱的含量高于属内其他各种,具有值得重视的资源保护与利用价值^[2],但是现在野连居群数量及个体数濒危稀少,野生资源相当匮乏。目前,对其药理、药化方面的研究相对较多^[2-3],但是对其遗传多样性研究未见报道。本研究旨在通过探讨野连的遗传多样性,为挖掘潜在的药用资源和开发新药提供良好基础。

RAPD 技术已经在中药研究领域得到较为广泛的应用,如用于中药源动植物分类、遗传关系、遗传多样性评价、DNA 指纹图谱的构建、资源保护及药材鉴定等^[4-6]。本研究首次运用 RAPD 技术对野生峨眉野连 10 个居群共 110 个个体进行分析,明确各居群之间的遗传结构、多样性水平及其种内变异,为保护峨眉野连这一重要药用资源及其栽培生产和育种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 实验所用峨眉野连采自四川峨眉、洪雅、雅安和重庆缙云山,其中采自缙云山的材料为 5 ~ 7 年不等的栽培种,其他均为野生种。选取当年生嫩叶,低温条件下带回实验室洗净、晾干,冻于 - 80 °C 的超低温冰箱中备用。居群的来源、编号及居群生长状况见表 1。

表 1 材料来源及生长状况

No.	来源	样本数	居群状况	No.	来源	样本数	居群状况
SS	四川峨眉石笋沟	10	野生	BL	四川洪雅炳灵	10	野生
SX	四川峨眉寿星桥	12	野生	WY	四川雅安望鱼	10	野生
LQ	四川峨眉龙桥	12	野生	YZ	四川洪雅燕子岩	12	野生
BD	四川峨眉扁担岩	10	野生	JY	重庆缙云山	12	人工
MT	四川峨眉木梯沟	12	野生	HS	四川洪雅黑山村	10	野生

[收稿日期] 2009-06-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30070080)

[通信作者] * 何平, Tel (023) 68254122, E-mail: heping196373@126.com

[作者简介] 张春平,博士,主要从事植物资源学与植物分子生物学研究, Tel 13667652727, E-mail: chungpingzhang520@163.com

1.2 DNA 的提取 本实验中采用改良后的 CTAB 法^[7]提取峨眉野连的基因组 DNA,所提 DNA 先用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳,染色后拍照,选择带型清晰、无拖尾的作为备用,然后再在核酸蛋白分析



仪上测其原始浓度,最后统一稀释至 $40\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,供 RAPD-PCR 实验所用。

1.3 RAPD 引物的筛选 RAPD-PCR 反应所用的引物由上海生工生物工程公司合成。共从 63 个随机引物 (10 bp) 中筛选出 14 个扩增条带清晰、多态性明显、反应稳定的引物用于 10 个居群的 110 个个体的扩增,每个选定的引物至少重复扩增 2 次。

1.4 PCR 扩增及产物检测 RAPD-PCR 反应在 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的 PCR 反应体系中进行,内含 $1 \times \text{PCR Buffer}$, $1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{dNTP}$, $0.20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 40 ng 模板, 1.0 U Taq DNA 聚合酶 。扩增程序为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min , 然后进行 35 个循环: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 40 s , $38\text{ }^\circ\text{C}$ 复性 60 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s , 循环结束后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。扩增产物在含 goldview (1%) 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离 1.5 h , 电压 $5\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。用 DL 2000 的 DNA marker ($100 \sim 2\text{ }000\text{ bp}$) 作为标记,电泳结束后在 Bio-Rad Gel Doc 2000 凝胶成像系统下观察并拍照纪录。

1.5 统计分析与数据处理 每个引物均经过重复扩增、电泳 2 次,选取稳定清晰的条带进行统计分析。电泳图谱的每条带 (DNA 片段),均为 1 个分子标记,代表一个引物的结合位点。根据分子标记的迁移率及有无来统计所有的二元数据,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。采用 POPGEN32 软件,计算各居群的多态位点百分率 (PPL), Nei 's 基因多样性指数 (H), Shannon 's 多态性信息指数 (I), 基因分化系数 (G_{st}), 居群总基因多样性 (H_t), 居群内基因多样性 (H_s), Nei 's 遗传一致度和遗传距离,并根据 Nei 's 遗传

一致度通过 NTSYS-pc 软件进行 UPGMA 聚类分析,构建系统树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果的遗传多样性分析 从 63 条 RAPD 引物中共筛选出 14 条用于 PCR 扩增,扩增条带的相对分子质量从 $100 \sim 2\text{ }000\text{ bp}$ 不等,见图 1。共扩出 132 条带,其中多态性条带 98 条,种水平上的多态性位点百分率为 74.24% ,见表 2,平均每个引物扩增条带数为 9.4,多态性条带数为 7.0。各居群水平上的多态位点百分率都低于种水平上的多态位点百分率 (74.24%)。不同群体的多态位点在 $47.73\% \sim 63.63\%$,其中最高的是四川峨眉木梯沟居群 (MT),为 63.63% ,四川峨眉扁担岩居群 (BD) 次之,为 60.61% ,最低的是四川洪雅燕子岩居群 (YZ),为 47.73% 。并由 POPGEN32 软件分析可得到其 Nei 's 基因多样性指数 (H) 为 $0.1947 \sim 0.3952$, Shannon 's 多态性信息指数 (I) 为 $0.2361 \sim 0.4817$,见表 2。Nei 's 基因多样性指数和 Shannon 's 多态性指数的大小与各居群多态位点百分率的高低趋势基本一致,各项系数均是木梯沟居群 (MT) 最高,洪雅燕子岩居群 (YZ) 最低。

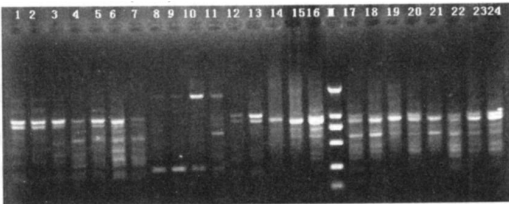


图 1 引物 S365 对 24 个野生野连样品的 RAPD 扩增电泳图

表 2 峨眉野连的遗传多样性

居群	个体数	多态位点数	多态位点 / %	Nei 's 指数 (H)	Shannon 's 指数 (I)
SS	10	68	51.52	0.2492	0.3145
SX	12	78	59.09	0.3209	0.4236
LQ	12	66	50.00	0.2273	0.2844
BD	10	80	60.61	0.3731	0.4635
MT	12	84	63.63	0.3952	0.4817
BL	10	75	56.82	0.3088	0.3987
WY	10	70	53.03	0.2756	0.3618
YZ	12	61	47.73	0.1947	0.2361
JY	12	64	48.48	0.1983	0.2625
HS	10	73	55.30	0.2904	0.3799
总计	110	98	74.24	0.2863	0.3624

注:各居群编号同表 1。



2.2 峨眉野连不同居群的遗传分化分析 根据总的基因多样性 (H_t) 和居群内遗传多样性 (H_s) 来计算居群间遗传差异在总遗传变异中所占的比例 (G_{st})。峨眉野连各居群的总基因多样性 (H_t) 为 0.413 8, 居群内遗传多样性 (H_s) 为 0.318 4, 居群间的遗传分化指数 (G_{st}) 为 0.230 5, 见表 4。这表明有 23.05% 的变异是存在于居群间的, 而 76.95% 的变异是存在于居群内的。居群的遗传分化表明, 峨眉野连居群内部具有较高的遗传分化, 绝大部分的遗传分化存在于居群内。

2.3 遗传距离和遗传一致度 根据 Nei's 遗传距

离, 采用 POPGEN32 分析软件得到峨眉野连 10 个居群的遗传距离和遗传一致度, 见表 3。各居群的遗传一致度为 0.501 6 ~ 0.884 3; 遗传距离为 0.193 1 ~ 0.524 5。其中峨眉扁担岩 (BD) 和峨眉寿星桥 (SX) 的遗传一致度最大, 为 0.884 3, 峨眉石笋沟 (SS) 和重庆缙云山 (JY) 的一致度最低, 为 0.501 6。遗传距离与遗传一致度恰恰相反, 遗传一致度最小的 2 个居群, 遗传距离表现的最大。峨眉石笋沟 (SS) 和重庆缙云山 (JY) 的遗传距离最大, 为 0.524 5。峨眉扁担岩 (BD) 和峨眉寿星桥 (SX) 的遗传距离最小, 为 0.193 1。

表 3 10 个峨眉野连居群的遗传一致度 (右上角) 和遗传距离 (左下角)

居群	SS	SX	LQ	BD	MT	BL	WY	YZ	JY	HS
SS		0.727 7	0.693 8	0.736 6	0.684 5	0.534 1	0.566 8	0.577 1	0.589 2	0.501 6
SX	0.213 2		0.731 2	0.884 3	0.765 4	0.573 7	0.591 2	0.608 6	0.590 3	0.674 1
LQ	0.327 5	0.314 7		0.704 1	0.720 1	0.583 6	0.593 1	0.674 2	0.632 2	0.736 8
BD	0.287 6	0.193 1	0.310 2		0.745 2	0.582 1	0.593 2	0.642 9	0.574 8	0.623 3
MT	0.332 7	0.276 3	0.297 4	0.223 1		0.687 3	0.636 6	0.630 2	0.671 9	0.501 4
BL	0.487 2	0.514 7	0.440 9	0.463 1	0.321 9		0.647 3	0.647 2	0.635 5	0.793 2
WY	0.476 9	0.493 4	0.431 1	0.453 2	0.394 3	0.371 7		0.674 5	0.697 1	0.644 1
YZ	0.503 4	0.460 2	0.341 8	0.397 4	0.403 5	0.365 9	0.344 3		0.683 2	0.734 8
JY	0.510 6	0.496 2	0.397 3	0.480 7	0.350 8	0.394 2	0.339 8	0.421 3		0.673 9
HS	0.524 5	0.342 1	0.243 5	0.401 1	0.514 7	0.237 4	0.394 2	0.307 4	0.365 1	

2.4 遗传聚类分析 根据 NTSYS-PC 分析软件的 UPGMA 法进行系统聚类分析可以得到 10 个野连居群的聚类分析图, 见图 2。从图中可以看出峨眉寿星桥居群 (SX) 和峨眉扁担岩居群 (BD) 首先进行聚类, 这说明 2 个居群的遗传距离最近, 然后再与峨眉木梯沟居群 (MT)、峨眉龙桥居群 (LQ) 和峨眉石笋沟居群 (SS) 进行聚类。而洪雅的 3 个居群中洪雅炳灵居群 (BL) 和洪雅黑山村居群 (HS) 首先进行聚类, 然后再与洪雅燕子岩居群 (YZ) 进行聚类。最后进行聚类的是雅安望鱼居群 (WY) 和重庆缙云山居群 (JY)。总的看来, 地理分布相近的居群都聚在了一起, 聚类结果显示与地理分布明显的一致性。

3 讨论

3.1 峨眉野连的遗传多样性 峨眉野连物种水平的多态位点百分率为 74.24%, 这表明峨眉野连具有较高的遗传多样性, 最低的为 47.73%, 最高的为 63.63%。野生峨眉野连 ($PPB = 74.24\%$, $H = 0.286 3$) 比其他野生的多年生草本植物如延龄草^[8] ($PPB = 34.07\%$, $H = 0.033 7$) 的遗传多样性要高得多。另外, 陈大霞^[9]对栽培黄连进行的 SRAP-PCR 进行了研究, 结果表明栽培种黄连的 $PPB =$

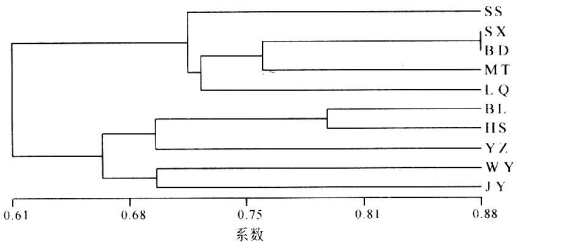


图 2 10 个峨眉野连居群间的 RAPD 聚类分析树状图

43.48%, 这明显低于本研究结果 74.24%, 其遗传相似性系数为 0.877 0 ~ 0.951 9, 而本研究的遗传相似性系数 0.501 6 ~ 0.884 3, 这说明峨眉野连比栽培黄连具有更大的遗传距离。

3.2 峨眉野连的遗传分化 根据 Nei's 遗传分化指数估算的 10 个居群间的遗传分化系数为 0.230 5, 说明居群间的遗传变异占总的基因多样性的 23.05%, 居群内占 76.95%。遗传分化的分析结果显示大量的变异主要存在于居群内部, 只有少量的变异存在于居群之间。峨眉野连居群较为严格的按照空间距离之间的联系聚在了一起, 这可能与生境有关, 地理距离近的居群生境相似, 地理距离远



的居群生境差异相对较大^[10]。峨眉山的 5 个居群聚在一起,洪雅的 3 个居群则聚在一起,这充分的反映了地理相关性。但是雅安望鱼居群(WY)和重庆缙云山居群(JY)却是单独聚类,而且与其他居群具有较远的遗传距离,这可能是由于其独特的地理生态环境使得 2 个居群与其他居群形成明显的差异。

3.3 峨眉野连的保护策略 遗传多样性是物种避免灭绝而长期生存的前提,遗传多样性的减少会降低居群短期和长期两方面适应环境变化的能力^[11]。基于峨眉野连本身的生物学习性,可对其实施就地保护和迁地保护^[12]。在就地保护时除了对所有种群进行必要的保护外,应选择遗传多样性程度高的居群进行重点保护,如四川峨眉木梯沟居群(MT)和四川洪雅燕子岩居群(YZ)。同时由于峨眉野连的遗传多样性主要保持在居群之内,在迁地保护时应尽量在每个居群多取样品。也可以在野生的环境下尝试仿野生栽培和种植幼苗补充实生苗数量的方法对其进行保护。综合上述方面,才能全面保护峨眉野连的遗传多样性。其次,峨眉野连本身对生长环境要求比较特殊,大多生长在海拔 1 000 m 以上的低温潮湿环境,保护好生境,才能保证它正常生长、繁育,从而保护其遗传多样性,为其适应自然选择打下基础。

[参考文献]

[1] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 第 1 册 [M].

北京:科学出版社,1991:524.

- [2] 庄平,黄明远. 峨眉山野生黄连个体生物量与生物碱含量研究[J]. 中草药,1994,25(8):425.
- [3] 周嘉裕,廖海,彭书明,等. 峨眉野连不同部位总生物碱和盐酸小檗碱的含量测定[J]. 时珍国医国药,2006,17(8):1408.
- [4] 刘万水,郭宝林,陈玉婷,等. 雷公藤属 3 种植物遗传关系与遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(16):1615.
- [5] 徐文斌,郭巧生,王长林. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(1):18.
- [6] 钱韦,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 SSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报,2000,42(7):741.
- [7] 邹喻萍,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001:140.
- [8] 李群,肖猛,郭亮,等. 四川省珍稀濒危植物延龄草遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报,2005,27(4):3.
- [9] 陈大霞,李隆云,瞿显友,等. 栽培黄连群体遗传关系的 SRAP 研究[J]. 中草药,2008,39(10):1552.
- [10] Jian S G, Tang T, Zhong Y, et al. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia[J]. Aquat Bot, 2004, 79(1):75.
- [11] Ellstrand N C, Elam D R. Population genetics consequences of small population size: Implications for plant conservation[J]. Annual Review, 1993,34:217.
- [12] 何平. 珍稀濒危植物保护生物学[M]. 重庆:西南师范大学出版社,2005:45.

RAPD analysis for genetic diversity of medicinal plant *Coptis omeiensis*

ZHANG Chunping¹, HE Ping¹, HE Junxing¹, ZHANG Yifeng¹, QIAO Yuanbao¹, ZHANG Min¹, SHI Zhongtian¹, HU Shijun²

(1. School of Life Sciences, Southwest University, Key Laboratory (Ministry of Education) of

Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources

Research for Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the genetic diversity of *Coptis omeiensis*. **Method:** The genetic diversity of 110 individuals from 10 populations was analyzed by RAPD. **Result:** 14 primers were selected to produce highly reproducible RAPD bands. Among 132 amplified bands, 98 showed polymorphism, the percentage of polymorphic bands reached to 74.24%. Nei's gene diversity index (*H*) was 0.2863, Shannon's information index (*I*) was 0.3624, *G_{st}* was 0.2305. The genetic distance coefficient and the similarity were 0.1931-0.5245 and 0.5016-0.8843, respectively. **Conclusion:** There exists a high genetic diversity in *C. omeiensis* and the majority of genetic variation occurs in the populations. By cluster analysis, the geographical distribution is very obvious. The RAPD marker can be used for the analysis of the genetic diversity and genetic variation of *C. omeiensis*.

[Key words] *Coptis omeiensis*; genetic diversity; RAPD; cluster analysis; genetic variation

doi: 10.4268/cjmm20100202

[责任编辑 吕冬梅]

· 141 ·