

云南铁线莲属 12 种药用植物的 RAPD 分析*

普春霞^{1,2}, 杨竹雅¹, 刘小莉¹

(1. 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650200; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘要:目的: 通过对 12 种铁线莲属药用植物进行遗传多样性和亲缘关系分析, 为生药鉴定提供依据。方法: 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析遗传多样性, UPGMA 类平均法进行聚类分析。结果: 利用筛选出的 10 个随机引物对供试材料 DNA 进行随机扩增, 共得到 89 条带, 其中多态性带有 89 条, 多态性百分率为 100%。采用 UPGM 聚类法对扩增出的谱带进行遗传聚类分析, 得出反映各种间亲缘关系的树状图。对多数种而言, 种间差异明显, 同种不同分布点也存在差异, 但同一分布点的不同个体差异较小。结论: 该标记技术对铁线莲属植物的生药鉴定是可行的, 在系统学方面的应用有待进一步研究。

关键词: 铁线莲属; RAPD; 生药鉴定

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000—2723 (2008) 05—0037—05

铁线莲属 (Clematis) 是一个全球分布的大属, 全世界约 300 余种, 中国 147 种, 云南是主要分布区, 分布有 56 种, 20 变种^[1]。本文作者对云南铁线莲属的药用种类进行重新整理, 确定云南共有 32 种, 7 变种^[2]。从中选取了 12 种进行 RAPD 分析, 希望能对云南省铁线莲属药用种类的生药鉴定提供依据。虽然 RAPD 带有一些明显的缺陷 (如无法鉴定杂合子及重复性), 但由于此方法对 DNA 质量要求较低, 也不需预先了解研究对象的基因组, 因此考虑到生药鉴定的特殊性, 仍选择此方法。同时, 实验证明同一实验室如果采用相同的 RAPD 流程, 在同一型号的 PCR 仪上运行有很好的重复性^[3~4]。在以往的研究中已有一定的工作采用此方法对铁线莲属进行了研究, 但数据量较小^[5], 加之受分类学研究的影响, 数据的可比性降低, 因此在本文中部分种出现重复。

同时, 目前对中国铁线莲属的研究仍集中于经典分类, 因此本文也将对此方法应用于铁线莲属系统发育研究的可行性进行探讨。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

本文中所用样品为在野外采集的成熟叶片, 用硅胶干燥后保存在 -20 (表 1)。

1.2 总 DNA 的提取

采用 2XCTAB 微量法提取总 DNA, 具体操作参照文献^[3]的方法, 略有改动, 整个提取过程均使用 1.5 mL 的离心管。提取出的总 DNA 溶解于适量无菌双蒸水, -20 冰箱保存, 备用。用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小, 均大于 20 kb, 可见紫外分光光度计 (日本岛津 UV-2450) 检测纯度。

1.3 PCR 扩增反应

在温度梯度 PCR 仪 (Whatman Biometra Tgradient) 上进行。扩增反应体系为 25 μL, 10Xbuffer 缓冲液 (无 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP (25 μmol/L) 2.0 μL, MgCl₂ (25 μmol/L) 1.5 μL, 扩增引物 (10 μmol/L) 2.0 μL, 模板 40 ng - 80 ng, Taq 酶 1.5 U, 加无菌双蒸水补充体积至 25 μL。PCR 扩增试剂购自大连宝生物工程有限公司。扩增程序: 94 下预变性 4 min, 36 复性 1 min, 72 延伸 90 s, 然后 94 1 min, 36 1 min, 72 90 s 进行 44 个循环, 最后 72 延伸 5 min, 4 保存。用筛选出

*基金项目: 云南省教育厅基金项目 (NO: 03Z710C)

收稿日期: 2008—03—20 修回日期: 2008—07—15

作者简介: 普春霞 (1977~), 女, 云南大理人, 讲师, 主要从事药用植物资源研究。 通讯作者: 普春霞, Tel: 0871-6212605, E-mail: yucca1977@yahoo.com.cn

表 1 样品编号

样品编号	学名	中文名	采集地	凭证标本保存地
1 - 1、1 - 2	<i>C. puberla</i> var <i>ganpiniana</i> (Levl & Van) W. T. Wang	扬子铁线莲	昆明	云南中医学院
2 - 1、2 - 2	<i>C. peterae</i> Hand - Mazz、	钝萼铁线莲	昆明	云南中医学院
2 - 3、2 - 4			腾冲	云南中医学院
3	<i>C. connata</i> DC	合柄铁线莲	昆明	云南中医学院
4 - 1、4 - 2	<i>C. chrysocoma</i> Franch	金毛铁线莲	昆明	云南中医学院
5 - 1、5 - 2	<i>C. buchananiana</i> DC	毛木通	昆明	云南中医学院
6	<i>C. ranunculoides</i> Franch	毛萸铁线莲	建水	云南中医学院
7 - 1、7 - 2、7 - 3	<i>C. napaulensis</i> DC	合苞铁线莲	腾冲	云南中医学院
8	<i>C. gouriana</i> Roxb ex DC	小袁衣藤	罗平	云南中医学院
9	<i>C. montana</i> Bnch - Ham. ex DC	绣球藤	泸水	KUN
10 - 1、10 - 2	<i>C. meyeniana</i> Walp.	毛柱铁线莲	福贡	KUN
11	<i>C. yunnanensis</i> Franch	云南铁线莲	泸水	KUN
12	<i>C. metuoensis</i> M. Y. Fang	墨脱铁线莲	泸水	KUN

注：以上标本除 *C. puberla* var *ganpiniana* (Levl & Van) W. T. Wang 由李锡文研究员鉴定外，均由作者鉴定，李锡文研究员审阅。KUN 为中国科学院昆明植物研究所标本馆的国际代码

的引物对所有个体的 DNA 进行 PCR 扩增。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

水平电泳仪 (Bio - RAD) 制胶时在胶中加入 500 ng/mL 溴化乙锭。电泳条件：扩增产物 15 μ L 加适量上样缓冲液，40 V 恒压，电泳时间 3h，电泳结束后，凝胶成像系统 (Tanon GIS - 2009) 观察，记录结果。

1.5 RAPD 随机引物筛选

10bp 寡核苷酸随机引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，共 200 个 RAPD 引物。筛选出多态性较强、重现性好的 10 个引物 (表 2)。

表 2 引物编号及扩增条带数

引物编号	条带数	引物编号	条带数
1. OPB - 1	10	6. OPH - 6	10
2. OPB - 2	9	7. OPH - 10	9
3. OPD - 12	11	8. OPL - 13	9
4. OPE - 18	7	9. ORM - 7	5
5. OPF - 15	11	10. OPO - 7	8

1.6 数据分析方法

电泳图谱中根据分子迁移率及其有无进行统计：有带计为 1，无带或模糊不能辨认计为 0。以种为单位用 Popgen32 软件选择 Nei 的无偏差遗传一致度 (unbiased identity)，计算出基于此的遗传距离，用 MEGA3.1 软件选择 UPGMA 法进行聚类

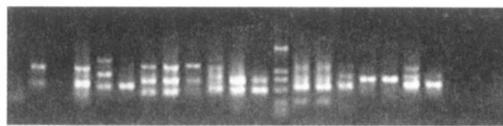
分析构建聚类图^[6]。

2 结果

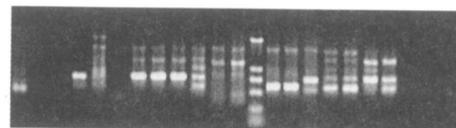
2.1 DNA 多态性

本文选择了 10 对引物 (表 2)，共计 89 条条带。10 个随机引物对铁线莲属 12 种植物的基因组 DNA 进行随机扩增，共得到 89 条带，其中多态性带有 89 条，多态性百分率为 100%。文中选出 2 个多态性最好的引物扩增出的代表性图 (图 1)。

OPO - 7



OPF - 15



Mark: DL2000

样品顺序为 1 - 1、1 - 2、2 - 1、2 - 2、2 - 3、2 - 4、3、4 - 1、4 - 2、5 - 1、5 - 2、6、7 - 1、7 - 2、7 - 3、8、9、10 - 1、11、10 - 2、12

Sequence of experimental sample: 1 - 1、1 - 2、2 - 1、2 - 2、2 - 3、2 - 4、3、4 - 1、4 - 2、5 - 1、5 - 2、6、7 - 1、7 - 2、7 - 3、8、9、10 - 1、11、10 - 2、12

图 1 引物 OPO - 7 和 OPF - 15 扩增结果

Fig. 1 Amplification results by primer OPO - 7 and OPF - 15

2.2 种间遗传距离和聚类分析

实验所得的 Nei 的无偏差遗传距离矩阵见表 3, 12 个种之间的遗传距离除 *C. yunnanensis* 和 *C. metuoensis* 之间以及这两者分别与 *C. puberla* 之间

的遗传距离小于 0.1 以外, 其余均大于 0.1。应用 UPGMA 法得聚类图 (图 2)。在此聚类图中, 小于 0.05 处, *C. yunnanensis*、*C. metuoensis* 与 *C. puberla* 形成第一个分支, 与遗传距离相呼应。

表 3 Nei 的无偏差遗传距离

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>C. puberla</i>	0.00002											
2 <i>C. peterae</i>	0.1341	0.0000										
3 <i>C. connata</i>	0.2197	0.1901	0.0000									
4 <i>C. chrysocoma</i>	0.2371	0.2710	0.2067	0.0000								
5 <i>C. buchananiana</i>	0.2218	0.2900	0.3171	0.3058	0.0000							
6 <i>C. ranunculoides</i>	0.2057	0.1367	0.2691	0.3185	0.3648	0.0000						
7 <i>C. napaulensis</i>	0.2359	0.3127	0.4710	0.3743	0.3371	0.3831	0.0000					
8 <i>C. gouriana</i>	0.1310	0.2170	0.3142	0.3342	0.3812	0.2691	0.3339	0.0000				
9 <i>C. montana</i>	0.2339	0.2816	0.2401	0.3732	0.3979	0.3455	0.4738	0.3298	0.0000			
10 <i>C. meyeniana</i>	0.1061	0.2022	0.3157	0.3357	0.3185	0.3003	0.3355	0.1991	0.3312	0.0000		
11 <i>C. yunnanensis</i>	0.0117	0.1622	0.2401	0.2290	0.2423	0.2260	0.2444	0.1579	0.2545	0.1326	0.0000	
12 <i>C. metuoensis</i>	0.0636	0.2049	0.2839	0.3030	0.2483	0.2691	0.2718	0.1982	0.2990	0.1719	0.0819	0.0000

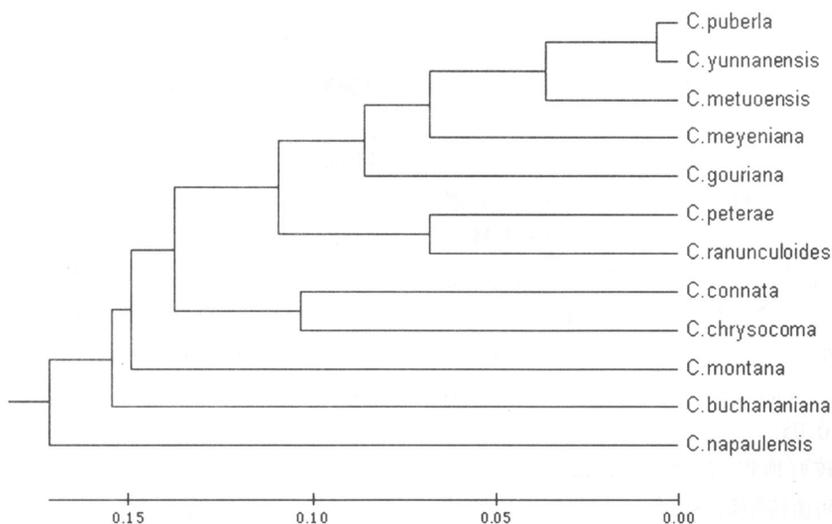


图 2 基于种间 Nei 的无偏差遗传距离的 UPGMA 聚类图

2.3 个体间遗传距离和聚类分析

在遗传距离中, 同种同产地的遗传距离小于 0.1, 同种不同产地的遗传距离在 0.1 - 0.2 之间, 而种间差异多大于 0.2。其中较为特殊的是 *C. yunnanensis*、*C. metuoensis* 分别和 *C. puberla* 的

遗传距离也小于 0.1, 与种间遗传距离的数据一致。在 UPGMA 聚类图中 (图 3), 同种同产地的分支均位于小于 0.05 处, 仅上述三种较为特殊, 位于小于 0.05 处, 且在第一分支中, *C. puberla* 和 *C. yunnanensis* 无法区分。

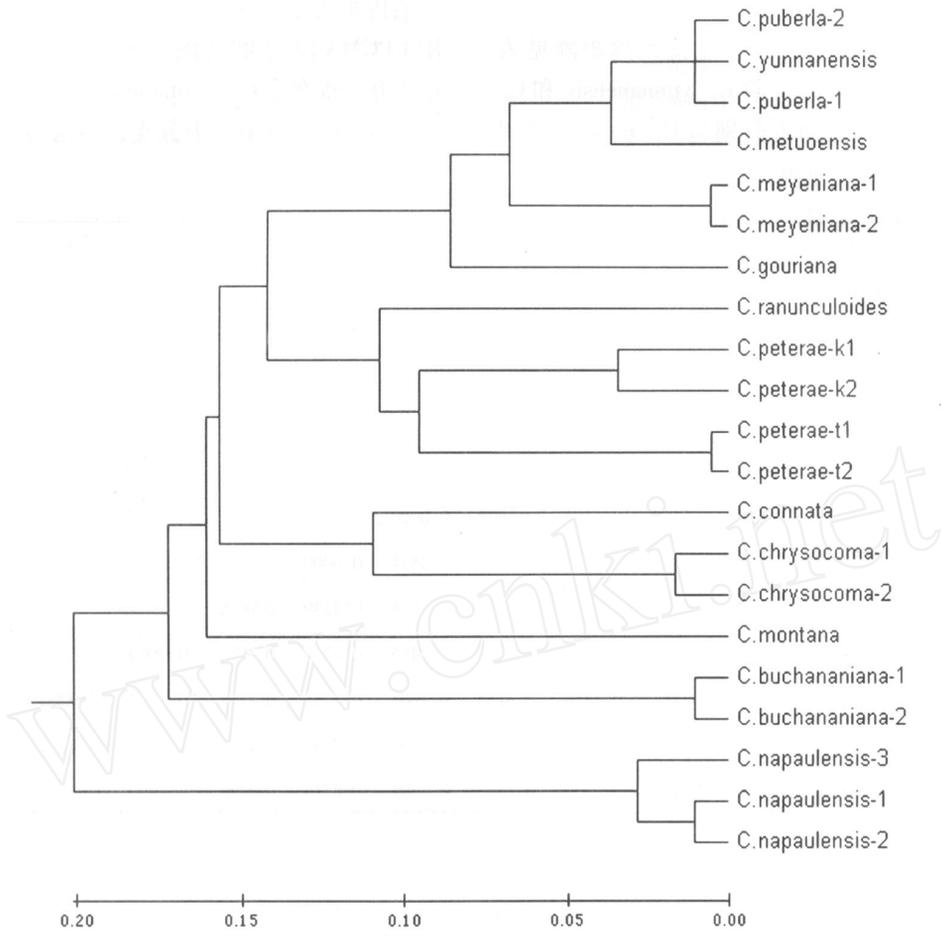


图 3 基于个体间 Ne 的无偏差遗传距离的 UPGMA 聚类图

3 分析与讨论

种间遗传距离的分析结果见表 3, 各种间的遗传距离从 0.0117 到 0.4738 不等。其中 12 个种之间的遗传距离除 *C. yunnanensis* 和 *C. metuoensis* 之间以及这两者分别与 *C. puberla* 之间的遗传距离小于 0.1 以外, 其余均大于 0.1。在图 2 中, *C. yunnanensis*、*C. metuoensis* 与 *C. puberla* 形成第一个分支小于 0.05。就总的情况而言, 依据种间遗传距离可以较好地将 12 种分开, 即便是上述 3 个种, 虽然种间遗传距离小, 但就目前扩增出的条带来看, 差异明显。在依据个体间遗传距离得到的 UPGM 聚类图中, 在第一分支处, *C. puberla* 和 *C. yunnanensis* 无法区分。就其原因而言, 主要是由于所选引物对这 2 个种不合适, 条带数太少, *C. puberla* 和 *C. yunnanensis* 仅为一条, 致使这两个种无法区分。因此在 UPGM 聚类图中, 可以看到出现了种间遗传距离大于种内遗传距离的情况。

对其他种而言, 种间差异明显, 同种不同分布点也存在差异, 但同一分布点的不同个体差异较小, 因此利用 RAPD 进行药用种类的种一级的鉴定和产地鉴定具有可行性。因此可以认为, 将 RAPD 分子标记的方法运用于铁线莲属的生药鉴定是可行的。同时, 选出的引物在一定程度上可以作为铁线莲属植物的通用引物。但仍需增加引物筛选和优化。

在经典分类的系统中, 绣球藤 *C. montana* Buch - Ham. ex DC, 金毛铁线莲 *C. chrysocoma* Franch, 合苞铁线莲 *C. napaulensis* DC 属于绣球藤亚属 subgen *Cheiropsis* Petem. 的绣球藤组 sect *Cheiropsis* DC; 小蓑衣藤 *C. gouriana* Roxb ex DC, 钝萼铁线莲 *C. peterae* Hand - Mazz, 扬子铁线莲 *C. puberla* var *ganpiniana* (Levl & Van) W. T. Wang, 毛柱铁线莲 *C. meyeniana* Wap. 属于欧洲铁线莲亚属 Subgen *Clematis* Keener & Dennis 的威灵仙组 Sect *Clematis* Tamu-

ra, 墨脱铁线莲 *C. metouensis* M. Y. Fang 属于欧洲铁线莲亚属 Subgen *Clematis* Keener & Dennis 的菝葜叶铁线莲组 Sect *Naraveliopsis* Hand - Mazz; 云南铁线莲 *C. yunnanensis* Franch 毛木通 *C. buchananiana* DC 合柄铁线莲 *C. connata* DC, 毛茛铁线莲 *C. ranunculoides* Franch 属于尾叶铁线莲亚属 Subgen *Vioma* Gray 的尾叶铁线莲组 Sect *Vioma* (Reichb.) Prantl^[7]。聚类图的结果与经典分类的结果不吻合, 意味着运用 RAPD 的分子标记的方法进行系统学的研究可能是不合适的, 这可能是由于实验所涉及的 12 个种分别属于铁线莲属的亚属, 加之铁线莲属是一个温带分布的全球性大属, 种类繁多, 分布范围广, 使得种间差异增大, 这意味着实验所得条带中非同源性条带的出现几率增加, 因而此方法对于重建系统可能是不合适的。若选择此方法进行系统学研究, 需要进一步的引物筛选增大数据量, 并对可能出现的非同源性条带加以注意。随着分子标记技术的发展, 各种新的技术不断产生, 如果要科学、准确地对植物的遗传多样性和亲缘关系进行研究, 还得运用多种分子标记技术, 将每种标记的结果和传统的分类结果进行

全面的比较和分析, 才能获得令人信服的结果。

[参考文献]

- [1] Wang WT et al. *Ranunculaceae*. In *Flora of China* Edited by Wu ZY and Peter HR. Beijing: Science Press, 2001, 6: 333 - 386
- [2] 陈文允, 普春霞. 云南省铁线莲属药用植物资源调查 [J]. 云南中医学院学报, 2006, 29 (1): 31 - 33
- [3] Clark MS 主编. 顾红雅主译. 植物分子生物学—实验手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1998: 8
- [4] 黄璐琦. 分子生药学 [M]. 北京: 医科大学出版社, 2000: 37 - 40
- [5] 张荣, 邵建立, 田学明, 等. 用 RAPD 分析法对铁线莲属 7 种中药的鉴定研究 [J]. 中草药, 1996, 27 (11): 686 - 687.
- [6] S Kumar, K Tamura, and M Nei. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004, 5: 150 - 163
- [7] 王文采, 李良千. 铁线莲属一新分类系统 [J]. 植物分类学报. 2005, 43 (5): 431 - 488

(编辑: 岳胜难)

RAPD Analysis of 12 Species of *Clematis*

PU Chun - xia^{1,2}, YANG Zhu - ya¹, LU Xiao - li¹

(1. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650200, China;

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

ABSTRACT: Objective: Genetic diversity among 12 species of *Clematis* L. were analyzed, and the result was the foundation information for identification of medicinal plants. Methods: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analyze genetic diversity, and the dendrogram was constructed by UPGM. Results: Ten RAPD primers were selected to apply for random amplification. A total of 89 DNA bands were detected, all which were polymorphic. The dendrogram by using UPGM claimed that the differences among most of species were dominant, and the differences among different distribution site of the same species could be identified, however, it was not easy to identify the same species at the same site. Conclusion: RAPD markers was suitable for identification of species of *Clematis*. But whether it was used for phylogenetics was not sure.

KEY WORDS: *Clematis*; RAPD; Identification of Medicinal Plants