

云南灯盏花遗传变异的 RAPD 分析*

周利杰¹, 李南高³, 虞泓^{1,2**}, 张时刚²

(1 云南大学生命科学学院生态学实验室, 云南 昆明 650091; 2 云南英茂生物技术实验室, 云南 昆明 650106; 3 昆明制药集团有限公司, 云南 昆明 650100)

摘要: 运用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术对云南灯盏花 (*Erigeron breviscapus*) 6 个居群进行分析, 研究其遗传变异及遗传结构, 用外类群紫菀对比分析其亲缘关系。随机挑选 16 个引物在 6 个居群中共产生 233 条 DNA 片段, 其中 192 条带具有遗传多态性, 约占 82.40%。多态位点百分比 PPB、等位基因数 A、有效等位基因数 Ae、Nei's 基因多样性指数 H 和 Shannon 多样性指数 I 在物种水平分别为 82.40%、1.8240、1.3005、0.1896、0.3021; 居群的平均值分别为 54.23%、1.5401、1.2691、0.1607、0.2460。灯盏花的遗传多样性较丰富, 基因分化系数 G_{st} 值为 0.3460, 有 65.40% 的变异来自居群内, 6 个居群的遗传一致度较高, 在 0.9037~0.9723 之间, 平均为 0.9410。利用 UPGMA 对 6 居群聚类分析, 结果表明: 丘北居群 (YB) 和文山居群 (YX) 亲缘关系最近, 小哨居群 (Y) 和新平居群 (YA) 次之, 丘北居群 (YB) 和腾冲居群 (ZA) 亲缘关系最远。遗传关系与各居群地理分布区间的距离大致成正相关。

关键词: 灯盏花; RAPD; 遗传多态性

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)01-0059-07

RAPD Analysis on the Genetic Variation of *Erigeron breviscapus* from Yunnan

ZHOU Li-Jie¹, LI Nan-Gao³, YU Hong^{1,2**}, ZHANG Shi-Gang²

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

2 Inmol Laboratory of Biotechnology of Yunnan, Kunming 650106, China;

3 Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was amplified to studied genetic diversity and genetic structure of 6 populations of *Erigeron breviscapus* in Yunnan province. As a contrast, one population of *Aster himalaicus* was selected to study their phylogenetic relationship. A total of 16 primers were screened to use, and 233 bands were amplified, among which 192 (82.40%) were polymorphic. At specific level, the percentage of polymorphic bands PPB, number of alleles A, effective number of alleles Ae, Nei's gene diversity H, and Shannon's Information index I were 82.40%, 1.8240, 1.3005,

* 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

** 通讯作者: 虞泓, 教授, 博士生导师。Tel: (0871) 7392184, Fax: (0871) 7392576, E-mail: fisher@ynimol.com

收稿日期: 2003-11-14, 2004-07-27 接受发表

作者简介: 周利杰 (1978-) 女, 吉林人, 在读硕士研究生, 研究方向植物遗传与进化。

0.1896, and 0.3021 respectively, and at population level were on average 54.23%, 1.5401, 1.2691, 0.1607, and 0.2460 respectively. G_{st} was 0.3460, meaning that 65.40% of the genetic variation was found within the populations. The genetic identity among the populations was high, ranging from 0.9037 to 0.9723 and averaging 0.9410. An analysis of 6 populations using UPGMA showed that, there was the closest relationship between Qiubei (YB) population and Wenshan (YX) population, then between Xiaoshao (Y) and Xiping (YA) populations, and the last between Wenshan (YX) population and Tengchong (ZA) population. The genetic distance is almost positively related to the spatial or geographical distance between the populations.

Key words: *Erigeron breviscapus*; RAPD; Genetic variation

灯盏花学名短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz, 为菊科紫菀族 Trib. Astereae Cass. 飞蓬属 *Erigeron* 植物, 俗名为灯盏花、灯盏细辛、灯盏草、灯顶草、地朝阳、东菊、双葵花等(李三无等, 1999), 产于湖南, 广西, 贵州, 云南, 西藏等省区, 常见于海拔 1 200 ~ 3 500 m 的中山和亚高山开旷山坡, 草地林缘(林谔和陈艺林, 1985), 为民间常用的中草药, 全草入药, 具散寒解表、祛风除湿、活络止痛的作用(赵新杰和夏华玲, 2002)。主治小儿疳积、小儿麻痹症后遗症和脑炎后遗症瘫痪等症(林谔和陈艺林, 1985)。临床用于治疗脑血栓形成, 脑血栓等脑血管以外所致完全性及不完全性瘫痪。对冠心病心绞痛(孔繁钰, 2000)、高粘滞血症等都有一定疗效(赵锦国和张爱英, 2000)。

作为一种药用植物, 目前对它的研究, 主要是有效化学成分的提取, 分离, 鉴定, 药理研究及临床应用, 对其化学组成已经有了比较全面的研究, 但其药理作用的研究还不够完善(刘宏等, 2002)。此外在生理生态学(苏文华等, 2001a, b)、人工栽培(俞宏渊等, 2002)、核型分析(冯定霞等, 2002)等方面均有相关报道。但一直以来, 关于灯盏花遗传多样性及其遗传结构研究报道较少, 仅见冯定霞等(2002)利用同工酶技术的研究报道。分子水平的研究工作至今还没有开展, 由于同工酶检测的是基因后的产物, 会受到生物发育阶段及环境条件等诸多因素的影响, 而且所反映的遗传信息量较少, 容易造成实验数据的偏低(李太武等, 2003), 为得到高信息量的遗传信息数据, 开展 DNA 分子水平的研究工作极为必要。RAPD 技术自 Williams 等(1990)创立以来, 由于其灵敏、方便、多态性高等优点, 被广泛用于多种动植物的系统进化、种质鉴定、群体遗传变异分析、目标性状基因的分子标记以及遗传图谱的快速构建等领域、尤其用于近缘种及种下水平的群体遗传研究(张娟等, 2003)。本文试图利用 RAPD 分子标记技术, 开展灯盏花居群遗传多样性和遗传结构分析, 为灯盏花药用植物保护、引种驯化、遗传育种、繁育栽培和 GAP 种植提供理论依据和方法措施。同时, 对灯盏花药材、GAP 种植优良品种进行 DNA 分子标记, 为建立灯盏花 DNA 指纹图谱奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

研究材料来源见表 1, 实验材料于 2001 年引种至昆明官渡区小哨乡白汉场英茂实验室基地(海拔 2 100 m), 按照采样地点暂定为 6 个居群。

1.2 研究方法

表 1 灯盏花居群及其外类群的材料来源

Table 1 Origins of populations of *Erigeron breviscapus* and outgroup

Species	Population No.	Origin	Altitude/m	Habitat
<i>Erigeron breviscapus</i>	Y	昆明市小哨	2 100	林中空地
<i>Erigeron breviscapus</i>	YA	新平县水塘	1 750	灌丛缓坡
<i>Erigeron breviscapus</i>	YB	丘北县双龙营	1 900	灌丛缓坡
<i>Erigeron breviscapus</i>	YX	文山县攀枝花	1 800	灌丛缓坡
<i>Erigeron breviscapus</i>	YZ	丽江市七合	2 520	松林边缘向阳缓坡
<i>Erigeron breviscapus</i>	ZA	腾冲县马站	1 980	火山口附近
<i>Aster himalaicus</i>	ZW	禄劝县轿子雪山	2 400	草地

1.2.1 总 DNA 提取

每株取约 0.5 g 新鲜叶片，用修改后的 CTAB 法（邹喻苹等，2001）提取总 DNA。将总 DNA 用含 0.5% 的溴化乙锭（ethidium bromide EB）的 1% 的琼脂糖凝胶（agarose gel）电泳检测，用 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng 的 λ DNA 作为半定量标准。模板 DNA 的工作浓度为 10 ng/ μ l。

1.2.2 RAPD 扩增反应及检测

从 6 居群中随机选取两个个体的 DNA 样品进行预备实验，选出有条带的引物，再从每个居群中各选择两个个体进行进一步的筛选，共筛选出 16 个能够获得清晰条带、重复性好、反应稳定的随机引物（上海 Sangon 合成 OPERON 公司序列，引物名称序列见表 2）。

表 2 RAPD 引物序号与序列

Table 2 List of primers and the sequences of dNTPs in RAPD

Primer	Sequence (5', -3')	Primer	Sequence (5', -3')
S5	TGCGCCCTCC	S93	CTCTCCGCCA
S18	CCACAGCAGT	S121	ACGGATCCTG
S29	GGGTAACGCC	S134	TGCTGCAGGT
S47	TTGGCACGGG	S159	ACGGCGTATG
S48	GTTGCGCCCA	S235	CAGTGCCTGT
S55	CATCCGTGCT	S372	TGGCCCTCAC
S67	GTCCCGACGA	S446	CCACGGGAAG
S82	GGCACTGAGG	S464	GTGTCCTCAGG

反应体系总体积为 25 μ l：Taq 酶（0.5 U/ μ l）（Promagar 公司）2 μ l，10 \times Buffer 2.5 μ l，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μ l，2.5 mmol/L dNTPs（Promagar 公司）2 μ l，引物（33 ng/ μ l）2 μ l，模板 DNA（10 ng/ μ l）2 μ l，dd H₂O 12.5 μ l，最后加一滴石蜡油防止蒸发。对照加入除去模板 DNA 以外的上述各成分，用双蒸水代替总 DNA。

PCR 扩增程序：使用 PE 公司 PE9700PCR 仪。预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，循环 14 次；94 $^{\circ}$ C 30 s，40 $^{\circ}$ C 1 min，循环 26 次；72 $^{\circ}$ C 继续

延伸 7 min。4 $^{\circ}$ C 无限循环。扩增产物用 0.5 μ g/ml EB 的 2% 琼脂糖凝胶（agarose gel）电泳，电泳缓冲液为 1 \times TBE，电压 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 2 为 RAPD 的指纹图谱。

1.2.3 数据分析

RAPD 是显性标记，电泳图谱的每一条带记为一个位点，只记录清晰可辨认的条带，同一引物扩增产物中电泳迁移率一条带被认为具有同源性，属于同一位点的产物并按扩增阳性“1”扩增阴性“0”带谱缺失记“.”形成 0/1 矩阵图输入计算机，作为外类群的 ZW 居群与其它研究居群在相同条件下进行实验，并同时进行数据统计。应用 POPGENE32 计算出各居群的多态条带比率（PPB），Shannon 多样性指数（I），等位基因数（A）平均有效等位基因数（ A_e ），遗传多样性指数（H）以及基因分化系数（ G_{st} ）等。形成 RAPD 表型数据矩阵，用非加权配对算术平均法 UPGMA（up weighted pair group method using arithmetic average method）进行聚类分析，建立居群间的亲缘关系树图（图 1）。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

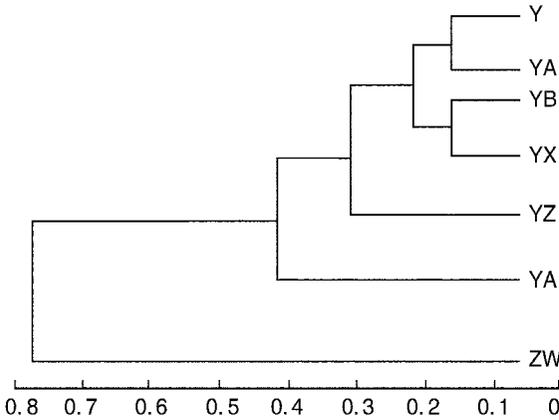


图1 7个居群的DNA多态性聚类分析树图型(UPMGA)

Fig. 1 Dendrogram of polymorphic DNAs of 7 populations

16个引物在灯盏花的6个居群中共扩增出233条带,其中192条具有多态性。总的多态条带比率(PPB)为82.40%,平均每个引物扩增出14.5条带。进一步比较居群间的PPB值,各居群的PPB分别为:小哨(Y)56.28%,新平(YA)42.50%,丘北(YB)55.49%,丽江(YZ)61.96%,腾冲(ZA)54.70%。结果显示在灯盏花种下水平的6个居群中YZ的多态位最高,YA的最低。居群的平均多态位为54.23%,居群间的多态位82.40%,灯盏花的遗传多样性较丰富(表3)。

表3 灯盏花6居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 6 populations of *Erigeron breviscapus*

Population	Variety	Bands	PB	PPB/%	A	Ae	H	I
Y	20	183	103	56.28	1.5628	1.2641	0.1614	0.2498
YA	12	160	68	42.50	1.4250	1.2333	0.1367	0.2066
YB	20	182	101	55.49	1.5549	1.2651	0.1605	0.2476
YX	20	173	92	53.18	1.5318	1.2976	0.1717	0.2575
YZ	20	184	114	61.96	1.6196	1.2909	0.1765	0.2729
ZA	20	177	96	54.23	1.5401	1.2691	0.1607	0.2460
Mean	18	177	96	54.23	1.5401	1.2691	0.1607	0.2460
Spiece	112	233	192	82.40	1.8240	1.3005	0.1896	0.3021

PB: 多态条带; PPB: 多态位点比率; A: 等位基因数; Ae: 有效等位基因数; H: Nei's 基因多样性; I: Shannon's 信息指数
 PB: polymorphic bands; PPB: percentage of polymorphic bands; A: Number of alleles; Ae: Effective number of alleles; H: Nei's gene diversity; I: Shannon's Information index

表4 云南灯盏花居群遗传分化分析

Table 4 G_{st} analysis of population genetic differentiation of *Erigeron breviscapus* from Yunnan

Species	H_t	H_s	D_{st}	G_{st}
<i>Erigeron breviscapus</i>	0.1872	0.1224	0.0648	0.3460

G_{st} : 基因遗传分化系数; H_t : 总基因遗传多样性; H_s : 种群基因遗传多样性; D_{st} : 居群间基因多样性

G_{st} : coefficient of gene differentiation; H_t : total gene diversity; H_s : gene diversity within population; D_{st} : gene diversity among populations

2.2 遗传分化

Nei (1973) 把总基因多样性 (H_t) 分解为居群内基因多样性 (H_s) 和居群间基因多样性 (D_{st}), 即: $H_t = H_s + D_{st}$, 而 $G_{st} = D_{st}/H_t$, 所以, 居群的基因分化系数 $G_{st} = (H_t - H_s)/H_t$ 。由表4可知, 灯盏花6个居群总的基因多样性指数 H_t 是0.1872, 居群内多样性指数 H_s 是0.1224, 居群间基因分化系数 G_{st} 是0.3460。灯盏花有65.40%的遗传变异

来自居群内, 34.60%来自居群间, 遗传变异主要分布在居群内, 但居群间已有较高分化。

2.3 遗传关系

表5列出了灯盏花6居群的遗传一致度 (Nei's genetic identity) 和遗传距离 (genetic distance), 灯盏花的遗传一致度高分布在0.9037~0.9717之间, 平均为0.9410。遗传距离

小在 0.0281 ~ 0.1012 之间，平均遗传距离为 0.0611，其中 YB 与 YX 之间的遗传一致度最高为 0.9723，遗传距离最小为 0.0281，表明二者之间亲缘关系最近。其次是 Y 与 YA 之间的一致度为 0.9717，遗传距离为 0.0287。而 YB 与 ZA 之间的遗传一致度最低 0.9037 遗传距离最大，此二者之间亲缘关系最远。其它的相似性居中亲缘关系也位于中间。

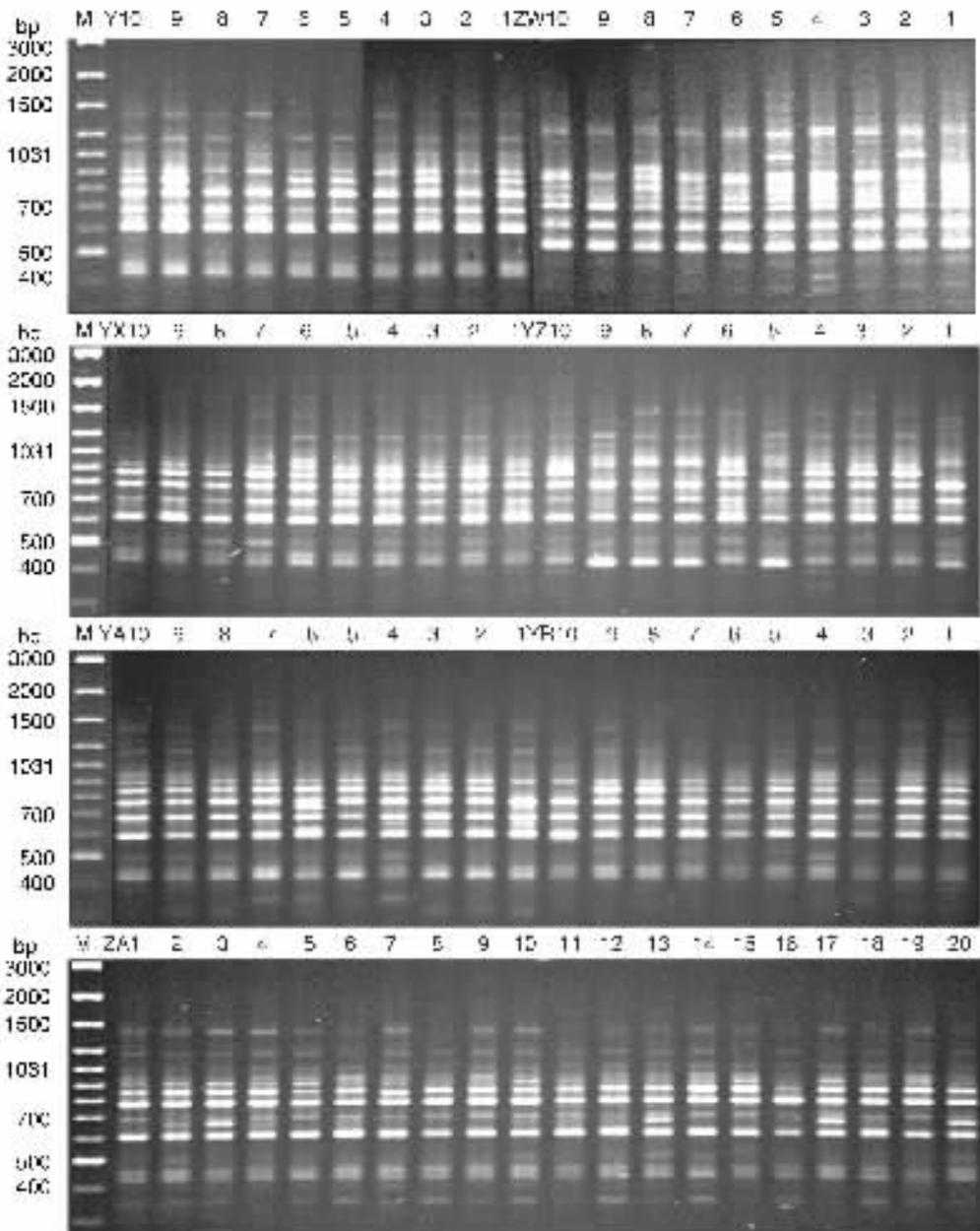


图 2 S29 引物对 7 个居群扩增的 DNA 指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprints of 7 populations by using RAPD primer S29

表 5 灯盏花居群的遗传关系

Table 5 Genetic relationship of *Erigeron breviscapus* populations

Population	Y	YA	YB	YX	YZ	ZA	ZW
Y	-----	0.9717	0.9663	0.9678	0.9442	0.9174	0.5091
YA	0.0287	-----	0.9548	0.9607	0.9296	0.9135	0.4911
YB	0.0343	0.0463	-----	0.9723	0.9360	0.9037	0.5098
YX	0.0327	0.0410	0.0281	-----	0.9536	0.9203	0.5126
YZ	0.0574	0.0730	0.0661	0.0475	-----	0.9044	0.5399
ZA	0.0863	0.0905	0.1012	0.0831	0.1005	-----	0.4952
ZW	0.6751	0.7111	0.6738	0.6682	0.6164	0.7029	-----

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

3 讨论

通过对灯盏花 6 居群的 RAPD 研究发现, 灯盏花遗传多样性丰富, 多态位点的百分比 PPB, 观察等位基因数 A , 有效等位基因数 A_e , Nei's 基因多样性指数 H , Shannon 多样性指数 I , 在物种水平和居群水平均表现出较高的多样性, 即物种水平分别为 82.40%, 1.8240, 1.3005, 0.1896, 0.3021; 居群水平分别为 54.23%, 1.5401, 1.2691, 0.1607, 0.2460。这与灯盏花是广布种, 在滇南, 滇东南, 滇中, 滇西北均有分布有关。

灯盏花基因分化系数 G_{st} 高达 0.3460, 即有 34.6% 的遗传变异存在于居群之间, 灯盏花居群之间遗传分化较大。由于灯盏花是广布种, 本研究所选用的居群地理距离较大, 而且不同分布区生态地理的差异、地理隔离以及具体生境的差别, 长期的自然选择, 致使不同分布区或生境的居群在形态、生理、遗传、生态习性等方面出现较大的分化, 甚至形成了生态型。

苏文华等 (2001b) 通过对灯盏花总黄酮含量在居群和个体中的分布调查, 发现灯盏花总黄酮不仅在不同居群间有大的差异, 而且在同一居群内个体间也存在较大的差异。冯定霞等 (2003) 在对灯盏花总黄酮含量变化的研究中发现, 与所有的表型一样, 灯盏花总黄酮含量的变化也受到环境因素和遗传因素共同作用的结果, 大棚内外灯盏花黄酮含量的差异主要受其遗传因素决定的, 通过遗传育种提高总黄酮含量前景广阔。丰富的遗传多样性表明, 选育灯盏花 GAP 优良品种遗传育种材料有大的潜力。本文所揭示的灯盏花居群的遗传多样性及其结构, 为灯盏花的育种提供了理论依据和育种素材。灯盏花居群和个体间的遗传距离为杂交育种及其亲本的选配提供了依据。

致谢 感谢师姐何显静, 云南英茂生物技术实验室的朱荣勋、李永谊、和锐等工作人员在实验及论文写作过程中给予的帮助; 感谢云南大学标本馆王焕冲等老师在标本鉴定过程中给予的帮助!

〔参 考 文 献〕

- 林镛, 陈艺林, 1985. 中国植物志第 74 卷, 菊科 (一) [M]. 北京: 科学出版社, 308—309
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东, 2001. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 16—40
- Feng DX (冯定霞), Chen B (陈勃), Dang CL (党承林), *et al*, 2002. Karyotype and allozyme analyses of three populations of *Erigeron breviscapus* of Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 24 (6): 754—758
- Feng DX (冯定霞), Chen B (陈勃), Dang CL (党承林), *et al*, 2003. Study on variation of total flavonoids in *Erigeron brevis-*

- capus [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drags* (中草药), **34** (4): 362—365
- Kong FY (孔繁钰), 2000. Twenty-eight instances of treatments to the unstable angina by using the Dengzhanhua Injection [J]. *Journal of Hengyang Medical College* (衡阳医学院学报), **28** (2): 184—185
- Liu H (刘宏), Yang XI (杨祥良), Xu HB (徐辉碧), 2002. Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drags* (中草药), **33** (6): 566—568
- Li SW (李三无), He P (何平), Li CY (李从越), 1999. A precious wild medicinal plant in Panxi area of Sichuan province [J]. *Subtrop Plant Res Commun* (亚热带植物通讯), **29** (2): 52—54
- Li TW (李太武), Li CH (李成华), Song LS (宋林生), *et al* , 2003. RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa* [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11** (2): 118—124
- Su WH (苏文华), Lu H (陆浩), Zhang GF (张光飞), *et al* , 2001a. Ecological and biological analysis of total flavonoids in *Erigeron breviscapus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drags* (中草药), **32** (12): 1119—1121
- Su WH (苏文华), Zhang GF (张光飞), Wang CY (王崇云), *et al* , 2001b. Preliminary studies on the physiological ecology of photosynthesis of *Erigeron breviscapus* [J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), **23** (2): 142—145
- Williams JGK, Kubelik AR, Livark KJ, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nuclei Acids Research* , **18** (22): 6531—6535
- Yu HY (俞宏渊), Chen ZL (陈宗莲), 2002. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **23** (2): 115—120
- Zhao JG (赵锦国), Zhang AY (张爱英), 2000. The effects of breviscapine on the blood viscosity in the patients with hyperviscosemia [J]. *Occupation and Health* (职业与健康), **16** (7): 82—83
- Zhao XJ (赵新杰), Xia HL (夏华玲), 2002. Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Li Shizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药), **13** (9): 566—567
- Zhang J (张娟), Yin LK (尹林克), Zhang DY (张道远), 2003. RAPD analysis on genetic diversity of natural populations of *Tamarix hispida* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25** (5): 557—562