

# 青阳参及其近缘种的 RAPD 研究

杨竹雅<sup>1</sup>, 普春霞<sup>1,2</sup>, 钱子刚<sup>1,2\*</sup> (1.云南中医学院, 昆明 650500; 2.中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

**摘要:** 目的 针对青阳参 *Cynanchum otophyllum* Schneid. 存在混淆种类和种内变异较大的情况, 对青阳参和与其相混淆的隔山消 *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. 和昆明杯冠藤 *C. wallichii* Wight 进行种间鉴别, 并对青阳参的4个居群进行遗传多样性分析。方法 运用随机扩增多态性DNA(RAPD)技术进行分析, 用Shannon指数和Nei指数评价青阳参的遗传多样性, 用UPGMA类平均法进行聚类分析亲缘关系。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72条带, 其中多态性带有70条, 多态性百分率为97.22%。由Shannon指数计算青阳参4个居群内的遗传多样性比率为68.52%, 高于居群间的31.48%; 同时由Nei指数估计青阳参4个居群中有69.44%的遗传变异来自居群内, 高于居群间的30.56%。采用UPGMA聚类法得出反映各种间亲缘关系的树状图。结论 运用RAPD方法可以进行青阳参和隔山消两个种同昆明杯冠藤的种间鉴别; 虽然居群间已有较高分化, 但青阳参遗传变异主要分布在居群内。

**关键词:** 青阳参; 隔山消; 昆明杯冠藤; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)07-0562-05

## RAPD Analysis on *Cynanchum Otophyllum* and Its Closely Related Species

YANG Zhuya<sup>1</sup>, PU Chunxia<sup>1,2</sup>, QIAN Zigang<sup>1,2\*</sup> (1. Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** There are confused species on *Cynanchum otophyllum* Schneid. and distinct intraspecies variation, interspecific identification has been done among *C. otophyllum*, *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. and *C. wallichii* Wight; Genetic diversity of 4 populations of *C. otophyllum* have been analyzed. **METHODS** Random amplified polymorphic DNA(RAPD) technique has been used to analyze. Genetic diversity of *C. otophyllum* has been evaluated by using Nei's gene diversity and Shannon's information index. The dendrogram has been constructed by UPGMA. **RESULTS** Ten RAPD primers have been selected to apply for random amplification. A total of 72 DNA bands are amplified among which 70(97.22%) are polymorphic. Shannon's information index is 68.52% within the populations of *C. otophyllum*, more than 31.48% among 4 populations of *C. otophyllum*; the index G<sub>st</sub> is 30.56% among 4 populations of *C. otophyllum*, less than 68.44% within the populations of *C. otophyllum*. The dendrogram of genetic relationship among three species has been constructed by using UPGMA. **CONCLUSION** RAPD is amplified to distinguish *C. wallichii* form *C. otophyllum* and *C. wilfordii*. Although there is distinct differentiation among populations of *C. otophyllum*, the great genetic variation happened within populations.

**KEY WORDS** *Cynanchum. Otophyllum* Schneid; *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl.; *C. wallichii* Wight; RAPD; genetic diversity

青阳参为萝藦科植物青羊参 *Cynanchum otophyllum* Schneid. 的根。主产于云南中部、西北部和东北部地区, 是云南的民间药物, 白族、纳西族、彝族等均有用药历史<sup>[1]</sup>。本种主治风湿痹痛, 肾虚腰痛, 腰肌劳损, 跌仆闪挫, 食积, 脘腹胀痛, 小儿疳积, 蛇、犬咬伤<sup>[2]</sup>。现已开发出青阳参片, 为云南特有中成药, 其有效成分为青阳参总苷<sup>[3]</sup>。动物实验结果表明青阳参总苷具有抗惊厥、抗实验性癫痫和增强免疫的作用<sup>[4-5]</sup>。同属植物昆明杯冠藤 *C. wallichii* Wight 和隔山消 *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl. 由于在形态上与青阳参相近, 常与青阳参混

用<sup>[6]</sup>。本研究采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术对采自云南丽江、楚雄、洱源、下关的青阳参和采自云南楚雄、嵩明的隔山消, 以及采自云南巍山的昆明杯冠藤的7个居群的样品进行了种内及种间分析, 分析青阳参及其近缘种隔山消和昆明杯冠藤的DNA变异情况, 为鉴别青阳参优良种质资源品系奠定基础, 并为今后的资源保护和开发提供理论依据。

### 1 实验材料

样品来源及编号见表1。由云南中医学院钱子刚教授鉴定。

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (No: 5J0401C)

作者简介: 杨竹雅, 女, 硕士, 助教 \*通信作者: 钱子刚, 男, 博士, 教授

Tel: (0871)6212605 E-mail: qianzig@yahoo.com.cn

表 1 样品来源及编号

Tab 1 The number of samples

样品编号	学名	中文名	采集地	凭证标本保存地
LJ	<i>Cynanchum otophyllum</i> Schneid.	青阳参	云南丽江	云南中医学院标本馆
CX	<i>C. otophyllum</i> Schneid.	青阳参	云南楚雄	云南中医学院标本馆
EY	<i>C. otophyllum</i> Schneid.	青阳参	云南洱源	云南中医学院标本馆
XG	<i>C. otophyllum</i> Schneid.	青阳参	云南下关	云南中医学院标本馆
SM	<i>C. wilfordii</i> (Maxim.) Hemsl.	隔山消	云南嵩明	云南中医学院标本馆
DC	<i>C. wallichii</i> Wight	昆明杯冠藤	云南巍山	云南中医学院标本馆

## 2 仪器与试剂

### 2.1 仪器

温度梯度 PCR 仪(Whatman Biometra Tgradient)、紫外分光光度计(日本岛津 UV-2450)、水平电泳仪(Bio-RAD)、凝胶成像系统(Tanon GIS-2009)。

### 2.2 试剂

液氮、CTAB(北京经科宏达生物公司)、Tris(美国 Amresco)、TaqDNA 聚合酶[宝生物工程(大连)有限公司]、随机扩增引物[上海生工生物工程技术服务有限公司]、DNA Marker DL2000[宝生物工程(大连)有限公司]、琼脂糖(美国 Amresco)、溴化乙锭。

## 3 实验方法

### 3.1 样品采集

由于青阳参、隔山消和昆明杯冠藤为缠绕草本,不同植株不易分开,因此在同一居群内选取距离大于 10 m 的个体的新鲜叶。在野外用变色硅胶干燥后保存于-20℃。

### 3.2 样品总 DNA 提取

采用常规 CTAB 法进行样品 DNA 的提取,略有改动。每个样取 1~2 片干燥叶片于乳钵中,迅速加入液氮和 0.5 μL 巯基乙醇快速研磨成粉末状,装入 1.5 mL 离心管。向盛有叶片粉末的离心管中加入 700 μL 65 ℃预热的 2×CTAB 提取缓冲液,混合均匀,然后在 65 ℃中温浴 1 h,这期间不断颠倒使样品与提取液充分混匀。待样品冷却至室温后,加入 600 μL 氯仿-异戊醇(24:1)颠倒混匀至溶液呈乳浊,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清。重复 1 次。加入 0.7 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min。小心倒掉上清液,70%乙醇洗沉淀 2 次,晾干。加入 50 μL TE 和 0.5 μL RNAaseA,于 37 ℃水浴锅温浴 30 min。加入 130 μL 70%乙醇和 0.2 mol·L<sup>-1</sup>乙酸钠 5 μL,颠倒混合均匀,-20 ℃下放置 1 h 以上,4 ℃ 10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃上清。70%乙醇洗沉淀 2 次,晾干,再溶于 50 μL 灭

菌双蒸水中,-20 ℃保存备用。紫外光检测 DNA 浓度及纯度。

### 3.3 RAPD 随机扩增引物筛选

自 OPA~OPI、OPM10 组 200 个引物中,以扩增具有多态性,条带大于 3 条,单个条带清晰、易于分辨为原则选取了 10 个引物,见表 2。

表 2 RAPD 引物序号及序列

Tab 2 List and sequences of RAPD primers

引物	序列(5'to3')
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-17	AGGGAACGAG
OPE-20	AACGGTGACC
OPG-10	AGGGCCGTCT
OPH-03	AGACGTCCAC
OPH-09	TGTAGCTGGG
OPH-12	ACGCGCATGT
OPH-17	CACTCTCCTC
OPH-19	CTGACCAGCC
OPM-14	AGGGTCTGTC

### 3.4 PCR 扩增反应

扩增反应体系为 25 μL, 10×buffer 缓冲液(无 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL、dNTP(25 μmol·L<sup>-1</sup>)2.0 μL、MgCl<sub>2</sub>(25 μmol·L<sup>-1</sup>)1.5 μL、扩增引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)2.0 μL、模板 100 ng、Taq 酶 1.5 U、加无菌双蒸水补充体积至 25 μL。

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。用筛选出的引物对所有个体的 DNA 进行 PCR 扩增。

扩增产物 15 μL 加适量上样缓冲液,经加入 EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳,40 V 恒压,电泳时间 3 h,电泳结束后,凝胶成像系统观察,记录结果。

### 3.5 数据分析

**3.5.1 条带计数** RAPD 是显性标记,每一个清晰可辨认的条带计为一个位点,有带计为 1,无带、弱带计为 0。形成 0/1 矩阵图输入计算机。

**3.5.2 用POPGENE32软件进行数据分析** 用Shannon表型多样性指数计算遗传多样性。计算公式为： $H = -\sum P_i \ln P_i$ ， $P_i$ 为表型频率，即某一扩增带出现的频率。 $H$ 可以有两种水平的遗传多样性， $H_{pop}$ 为居群内的遗传多样性， $H_{sp}$ 为种内的遗传多样性。居群内遗传多样性占总多样性的比例为 $H_{pop} / H_{sp}$ ；居群间遗传多样性占总多样性比例为 $(H_{sp}-H_{pop}) / H_{sp}$ ，又称遗传分化系数<sup>[7]</sup>。

用Nei指数估算基因多样性。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 $G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$ <sup>[8]</sup>。

**3.5.3 用Mega2软件进行聚类** 用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析，建立居群间的亲缘关系树状图。

## 4 结果

### 4.1 遗传多样性

10个引物在6个居群中共扩增出72条带，其中具有多态性的条带为70条，多态位点比率为97.22%。引物扩增结果见图1。

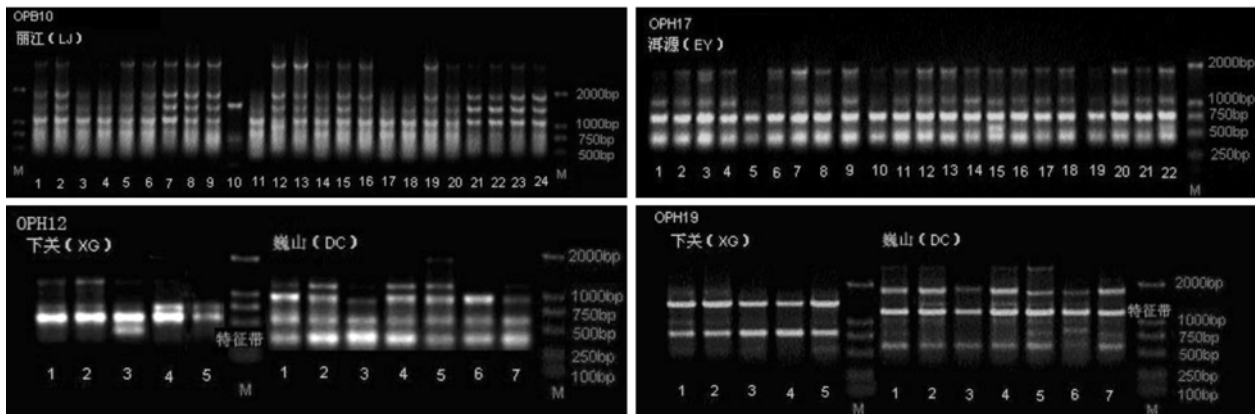


图1 引物OPB-10、OPH-17、OPH-12和OPH-19的扩增结果

Fig 1 Amplification results by primer OPB-10, OPH-17, OPH-12 and OPH-19

### 4.2 青阳参及其近缘种的遗传距离和聚类

实验样品选取的是采自丽江(LJ)的青阳参、采自嵩明(SM)的隔山消和采自巍山(DC)的昆明杯冠藤。青阳参居群的选取依据是：丽江为青阳参主产区之一，并且实验样本较多，结果较可信。实验所得的Nei的无偏差遗传距离矩阵见表3，UPGMA聚类见图2。

表3 青阳参、隔山消和昆明杯冠藤的Nei的无偏差遗传距离  
Tab 3 Nei's Unbiased Measures of Genetic distance of *C. otophyllum* Schneid. *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl., *C. wallichii* Wight

	青阳参	隔山消	昆明杯冠藤
青阳参(LJ)	0.000 0		
隔山消(SM)	0.101 2	0.000 0	
昆明杯冠藤(DC)	0.356 2	0.324 5	0.000 0

对青阳参及其近缘种的3个居群进行聚类分析，结果表明：青阳参和隔山消的遗传距离为0.101 2，亲缘关系最近，相比较之下，昆明杯冠藤同青阳参和隔山消的遗传距离分别为0.356 2和0.324 5，亲缘关系较远。从3个居群各个体的UPGMA聚类图分析，同一个种各个体均聚在一起，因此，用RAPD方法可以进行3个种的种间鉴别。其中，引物OPH-12

和OPH-19在昆明杯冠藤中分别扩增出的碱基数约为275 bp和1 200 bp的条带清晰、明亮，重复性好，是青阳参和隔山消没有的条带，可以考虑为昆明杯冠藤的特征带，见图1。在青阳参和隔山消中尚未发现特征带。

### 4.3 青阳参种内水平的遗传分化

对青阳参*Cynanchum otophyllum* Schneid.的4个居群：丽江(LJ)居群、楚雄(CX)居群、洱源(EY)居群和下关(XG)居群进行遗传多样性分析，结果见表4。

表4 青阳参4个居群的遗传多样性

Tab 4 genetic diversity of 4 populations of *C. otophyllum*

居群	样本	PB	PPB/%	A	Ae	H	I
丽江	24	38	52.78	1.527 8	1.301 1	0.176 8	0.265 8
楚雄	17	40	55.56	1.555 6	1.325 3	0.190 3	0.285 0
洱源	22	38	52.78	1.527 8	1.345 5	0.197 5	0.290 9
下关	5	26	36.11	1.361 1	1.246 4	0.139 9	0.205 7
平均	17	36	49.31	1.493 1	1.304 6	0.176 1	0.261 9

注：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表型多样性指数

Note: 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

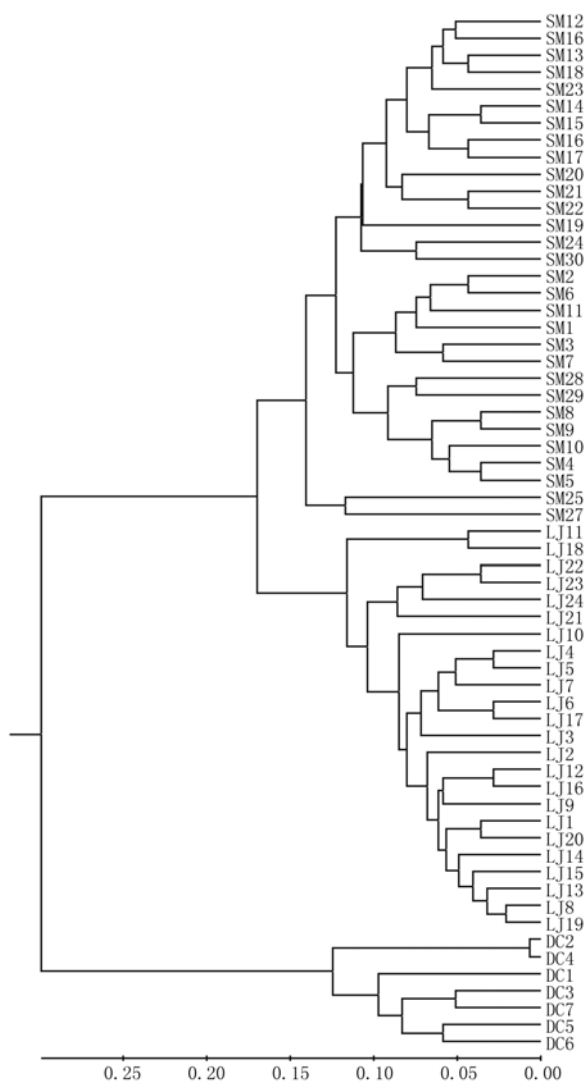


图 2 青阳参、隔山消和昆明杯冠藤各个体的DNA多态性聚类分析树状图(UPGMA)

Fig 2 Dendrogram of polymorphic DNAs of *C. otophyllum* Schneid. *C. wilfordii* (Maxim.) Hemsl., *C. wallichii* wight

4个居群中多态位点比率最高是楚雄(CX)居群,为55.56%,最低是下关(XG)居群,为36.11%。居群的平均多态位为49.31%,青阳参的遗传多样性较丰富。

用Shannon表型多样性指数计算青阳参的遗传多样性。平均遗传多样性:洱源(EY)居群最高,为0.2909,其次为楚雄(CX)居群,为0.2850,再次为丽江(LJ)居群,为0.2658,最低的是下关(XG)居群,为0.2057,4个居群的平均遗传多样性为0.2619。在总遗传变异中有,68.52%存在于居群内,31.48%存在于居群间,即4个居群间的遗传分化为31.48%。

用Nei指数估算青阳参的基因多样性。青阳参的4个居群总的基因多样性指数Ht是0.2537,居群内多样性指数Hs是0.1761,居群间基因多样性指数Gst是

0.3056,即居群间的遗传分化为30.56%,居群内的为69.44%。

实验所得的青阳参4个居群的Nei的无偏差遗传距离矩阵见表5,4个居群各个体的UPGMA聚类图见图3。

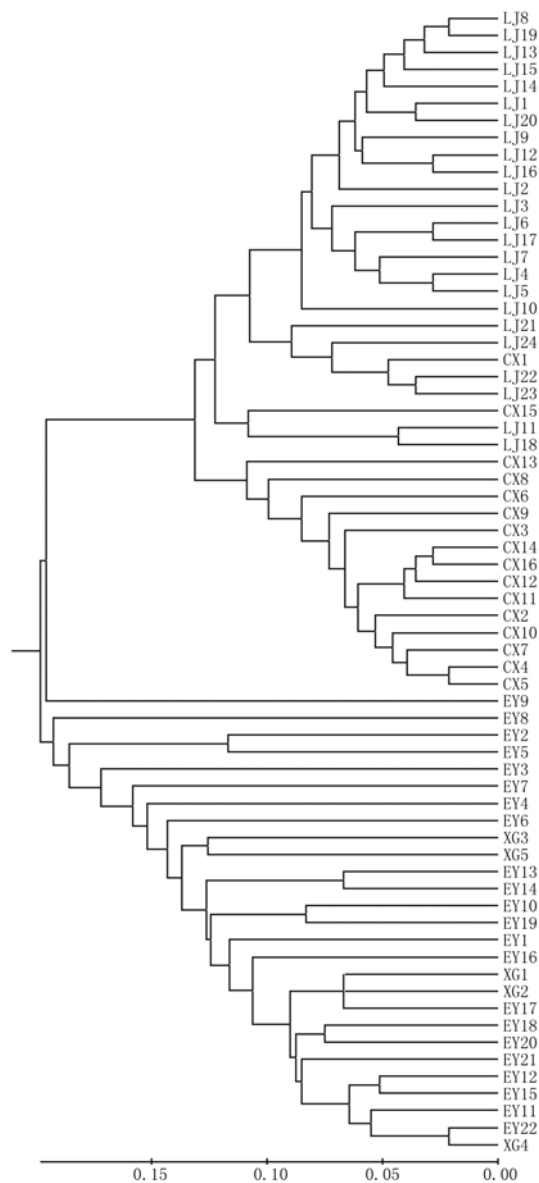


图 3 青阳参4个居群各个体的DNA多态性聚类分析树状图(UPGMA)

Fig 3 Dendrogram of polymorphic DNAs of each individuality of *C. otophyllum*

表5 青阳参4个居群的Nei的无偏差遗传距离

Tab 5 Nei's unbiased measures of genetic distance of 4 populations

	丽江(LJ)	楚雄(CX)	洱源(EY)	下关(XG)
丽江(LJ)	0.000 0			
楚雄(CX)	0.078 7	0.000 0		
洱源(EY)	0.159 7	0.129 9	0.000 0	
下关(XG)	0.183 3	0.152 9	0.050 5	0.000 0

对青阳参4个居群进行聚类分析,结果表明:此4个居群的遗传距离分布在0.050 5~0.183 3之间,亲缘关系较近,其中EY和XG遗传距离为0.050 5,亲缘关系最近,LJ和XG遗传距离为0.183 3,亲缘关系相对较远。从4个居群各个体的UPGMA聚类图分析,4个居群可以明显的分为两组,其中,丽江(LJ)居群个体与楚雄(CX)居群个体聚在一起为一组,下关(XG)居群个体与洱源(EY)居群个体聚在一起为一组,但是,丽江(LJ)居群个体与楚雄(CX)居群个体没有完全按照产地聚类,洱源(EY)居群个体与下关(XG)居群个体也没有完全按照产地聚类。

## 5 分析与讨论

通过对采自丽江的青阳参、采自嵩明的隔山消和采自巍山的昆明杯冠藤各个体聚类分析发现,同一个种的不同个体可以很好的聚在一起。因此,用RAPD方法可以将青阳参、隔山消和昆明杯冠藤进行区分。同时,采自巍山的昆明杯冠藤居群有两条特征带,可以考虑为鉴别该种的分子依据。青阳参的丽江居群与隔山消的嵩明居群从遗传距离上显示出亲缘关系较近。

由Shannon指数计算青阳参4个居群内的遗传多样性比率为68.52%,高于居群间的31.48%;由Nei指数估计青阳参4个居群有69.44%的遗传变异来自居群内,高于居群间的30.56%。表明:虽然居群间已有较高分化,但青阳参遗传变异主要分布在居群内。本研究采集的居群样品地理距离较大,而且,不同居群的生境有差别,丽江居群、楚雄居群生长于光照充足、相对干燥的环境,而洱源居群和下关居群生长于阴暗、潮湿的树林中,因此不同居群的青阳参在遗传等方面出现较大的分化可能与其地理隔离以及适应不同生境有关<sup>[9]</sup>;同时,也可以初步推测楚雄居群中有的个体与丽江居群同源,下关居群与洱源居群同源;此外,也不排除可能是由于RAPD方法采用的是任意引物在基因组上随机扩增,相同相对分子质量的扩增带可能同源也可能不同源,而导致的实验误差<sup>[10]</sup>。另外,由于丽江居群个体和楚雄居群个体没有完全按照产地聚类,同时,洱源居群个体和下关居群个体也没有完全按照产地聚类,可以初步推断,用RAPD方法进行青阳参的产地鉴别是不可行的。

因此,运用RAPD方法可以进行青阳参、隔山消和昆明杯冠藤3个种的种间鉴别,但是,尚无法用于青阳参的产地鉴别。要完成青阳参的产地鉴别,还需

要采集更多的居群样品进行试验,以及运用其他分子标记技术,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,才能获得更可靠的结论。

此外,由于RAPD引物是10个碱基的寡核苷酸片段,在退火温度下,引物与模板的互补结合不很稳定,容易受到诸多因素的影响:模板浓度与纯度、引物与dNTP用量、缓冲系统的种类与pH值、MgCl<sub>2</sub>的浓度、聚合酶的种类与用量、扩增程序与循环周期等都会影响扩增式样,其中尤为重要是所用PCR仪的型号。不同厂家生产的不同型号的PCR仪具有不同的变温速率,这个参数决定扩增片段的大小范围。实验证明同一实验室如果采用相同的RAPD流程(反应程序与反应成分),在同一型号的PCR仪上运行有很好的重复<sup>[10]</sup>。

## REFERENCES

- [1] National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products. China's National Drug (中国民族药志)[M]. Vol.1. Beijing:People's Medical Publishing House, 1984: 312-316.
- [2] Compendium of the Chinese Herbal Medicine Group. The Compilation of Chinese Herbal Medicine(全国中草药汇编)[M]. Vol.1. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975: 480.
- [3] MING Q Z, DONG Y, ZOU X Y. RP-HPLC assay for cynanchogenin in Qingyangshen tablet [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(8): 1156-1157.
- [4] LI J Y, CAI X L, ZHAO T R, et al. Effect of total glucosides of Qingyangshen (cynanchum otophyllum) on glutamate decarboxylase and GABA transaminase in mouse brain [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1987, 18(6), 264-266.
- [5] KUANG P G, WU Y X, MENG F J, et al. Treatment of grand mal seizures with "Qingyangshen" (root of cynanchum otophyllum) and observations on experimental animals [J]. Academy Tradit Chin Med (中医杂志), 1981, 1(1): 19-24.
- [6] ZHANG Y D, ZHONG Y, QU X Y. A study on variety of tujia medicine geshangxiao [J]. Chin J Ethnomed Ethno-pharm(中国民族医药杂志), 2003, 64(5): 304-306.
- [7] ZHAO R, CHENG Z, LU W F, et al. Sampling strategy within a wild soybean population based on its genetic variation detected by molecular markers [J]. Chin Sci Bull(科学通报), 2006, 51(9):1043-1048.
- [8] ZHOU L J, LI N G, YU H, et al. RAPD analysis on the genetic variation of erigeron breviscapus from Yunnan [J]. Acta Bot Yunnan(云南植物研究), 2005, 27(1): 59-65.
- [9] ZHAO X M, SONG X Y. Genetic Evolutionary(生物遗传进化学)[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2003: 333-343.
- [10] ZOU Y P, GE S, WANG X D. Molecular Markers on Systematic and Evolutionary Botany(系统与进化植物学中的分子标记)[M].Beijing: Science Press, 2001: 47-49.

收稿日期: 2008-03-24