

云南丽江山慈菇遗传多样性的 DALP 分析*

王海英¹, 虞泓^{1,2**}, 李南高³, 和锐², 张明宇¹

(1 云南大学生命科学院生态遗传学实验室, 云南昆明 650091; 2 云南英茂生物技术实验室, 云南昆明 650106; 3 昆明制药集团股份有限公司, 云南昆明 650100)

摘要: 采用 DALP (Direct amplification of length polymorphism) 分子标记技术, 对产自云南的药用植物丽江山慈菇 *Iphigenia indica* (L.) Kunth 的 9 个居群进行 DNA 指纹检测。筛选出 5 个引物组合, 扩增共产生 131 条 DNA 片段, 其中 104 条谱带具有遗传多态性, 约占 79.39%, 平均每组引物扩增所得多态条带为 20.8, 9 个居群平均多态百分率为 42.21%。9 个居群平均观察等位基因数 N_a 为 1.4224, 总 N_a 为 1.7939; 平均有效等位基因数 N_e 为 1.3141, 总 N_e 为 1.4810; 平均遗传多样性指数 H 为 0.1745, 总 H 为 0.2831; 平均 Shannon 多样性指数 I 为 0.2527, 总 I 为 0.4231; 总基因多样性 H_t 为 0.2831, 居群内多样性 H_s 为 0.1745, 居群间基因分化系数 G_{st} 为 0.3834, 即丽江山慈菇有 61.66% 的遗传变异来自居群内, 38.34% 来自居群间, 居群间存在较高水平的遗传分化。滇西北居群的遗传多样性明显高于滇中居群的遗传多样性, 这与滇中地区丽江山慈菇野生资源被大规模挖掘有着直接的关系。

关键词: 丽江山慈菇; DALP; 遗传多样性

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)02-0156-07

DALP Analysis on Genetic Diversity of *Iphigenia indica* in Yunnan

WANG Hai-Ying¹, YU Hong^{1,2**}, LI Nan-Gao³, HE Ru², ZHANG Ming-Yu¹

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

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

3 Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

Abstract: DALP (Direct amplification of length polymorphism) was applied to detect DNA fingerprints of 9 populations of *Iphigenia indica* (L.) Kunth in Yunnan. Five primer groups were screened in the 9 populations. Among 131 DNA fragments amplified 104 were polymorphic, i. e., the percentage of polymorphic bands (PPB) in the 9 populations of *Iphigenia indica* was 79.39%. The average number of DNA polymorphic band amplified by each primer group was 20.8 and the average PPB was 42.21%. In the 9

* 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, 云南大学植物学博士点基金资助

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

收稿日期: 2004-07-05, 2004-10-21 接受发表

作者简介: 王海英 (1978-) 女, 汉族, 湖南人, 在读硕士研究生, 主要从事植物生态遗传的研究。

populations, the total observed number of alleles (N_a) was 1.7939 and the average N_a was 1.4224; the total effective number of alleles (N_e) was 1.4810 and the average N_e was 1.3141; the total of Nei's (1973) gene diversity (H) was 0.2831 and the average H was 0.1745; the total Shannon's Information index (I) was 0.4231 and the average I was 0.2527; the total gene diversity (H_t) was 0.2831 while the gene diversity within a population (H_s) was 0.1745. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) was 0.3834 between populations, namely 38.34% genetic variation occurring between populations and 61.66% within a population. The genetic diversity of population in northwestern Yunnan was evidently higher than that in central Yunnan. This might be a result of overexploitation of the resources of this species in central Yunnan in recent years.

Key words: *Iphigenia indica*; DALP; Genetic diversity

丽江山慈菇 *Iphigenia indica* (L.) Kunth ($2n = 22$, Rama 等, 1987) 又名草贝母、山慈菇、益辟坚、土贝母、假贝母、滇西北土称闹狗药, 为百合科 (Liliaceae L.) 山慈菇属 (*Iphigenia* Kunth) 的多年生草本植物, 分布于云南中部至西北部, 四川西南部, 贵州西部和西藏等; 生于 1 900 ~ 3 300 m 松林边缘或向阳山坡草地。国外也见于印度西北部至东北部、缅甸北部、斯里兰卡、菲律宾, 澳大利亚也有分布 (汪发缙和唐进, 1980; 吴征镒等, 1997)。Manske (1960) 报道在云南丽江山慈菇中发现秋水仙碱 (colchicine); 周俊等 (1977) 研究丽江山慈菇的化学成分, 发现丽江山慈菇含秋水仙碱和光秋水仙碱等 4 ~ 5 种微量生物碱。秋水仙碱对肝癌、乳腺癌、食道癌、皮肤癌、淋巴肉瘤均有抑制作用; 民间以鳞茎入药, 有毒, 用于散寒平喘, 止咳化痰, 拔毒消肿, 软坚散结 (吴征镒等, 1997)。迄今为止, 关于丽江山慈菇居群遗传多样性及其遗传结构研究的报道还十分少见。

本文对丽江山慈菇滇西北 7 个居群和滇中 2 个居群进行了 DALP 检测 (Direct amplification of length polymorphisms——直接扩增长度多态性)。DALP 是 1998 年法国科学家 Desmarais、Lanneluc 和 Lagnel 发展起来的, 通过随机引物 (AP-PCR) 扩增出不同长度 DNA 片段, 以检测 DNA 多态性的一种 DNA 分子标记技术。DALP 采用双引物对未知序列的基因组 DNA 进行扩增, 反向引物采用 M13 反向测序引物, 为一个不变的 24 mer 寡核苷酸; 选择性引物采用 M13 斥序引物核心序列 (-40USP), 并在 3' 端加上 0 ~ 4 个选择性碱基以产生不同的扩增图谱。本实验采用复旦大学设计的反向引物 DALPR2 5'-AACAG CTATGAC-CATGA-3' (表 2)。本文试图利用此分子标记对丽江山慈菇居群遗传多样性和遗传结构进行分析, 为丽江山慈菇这一药用植物的引种驯化、遗传育种、繁育栽培和标准化种植提供理论依据; 同时, 为建立丽江山慈菇药材及其优良品种的 DNA 指纹图谱奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

材料取自引种至云南昆明官渡区小哨乡白汉场英茂生物实验室保育基地 (海拔 2 100 m) 的 7 个滇西北居群和 2 个滇中居群 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取 本文采用改良后的 CTAB 法 (Dolye 等, 1987; Rogers and Bendich, 1985) 提取基因组 DNA, 每株取 0.3 ~ 0.5 g 新鲜叶片。

distance), 等位基因数 N_a (number of alleles), 有效等位基因数 N_e (the number of effective alleles), 以及基因分化系数 G_{st} ($= D_{st}/H_t$) 等, 同时结合 treeview 软件对得到的遗传距离矩阵进行非加权配对算术平均法 (UPGMA) 聚类分析, 构建聚类图。

2 实验结果及分析

2.1 遗传多样性

丽江山慈菇 9 个居群, 5 组 DALP 引物扩增得到 131 条清晰条带 (图 1), 平均每个引物扩增条带数为 26.2, 其中 104 条为多态条带, 多态百分率为 79.39%; 平均每组引物扩增所得多态条带为 20.8, 9 个居群平均多态百分率为 42.24%。其中丽江玉龙雪山居群 (Ca) 多态百分率最高为 51.91%, 丽江玉龙县茨科居群 (Cf) 次之, 为 51.15%。滇西北地区的多态百分率高于滇中地区, 如表 3。滇西北地区居群的多态百分率范围在 41.22% ~ 51.91%, 滇中地区两居群的多态百分比分别为 25.19% 和 26.72%。

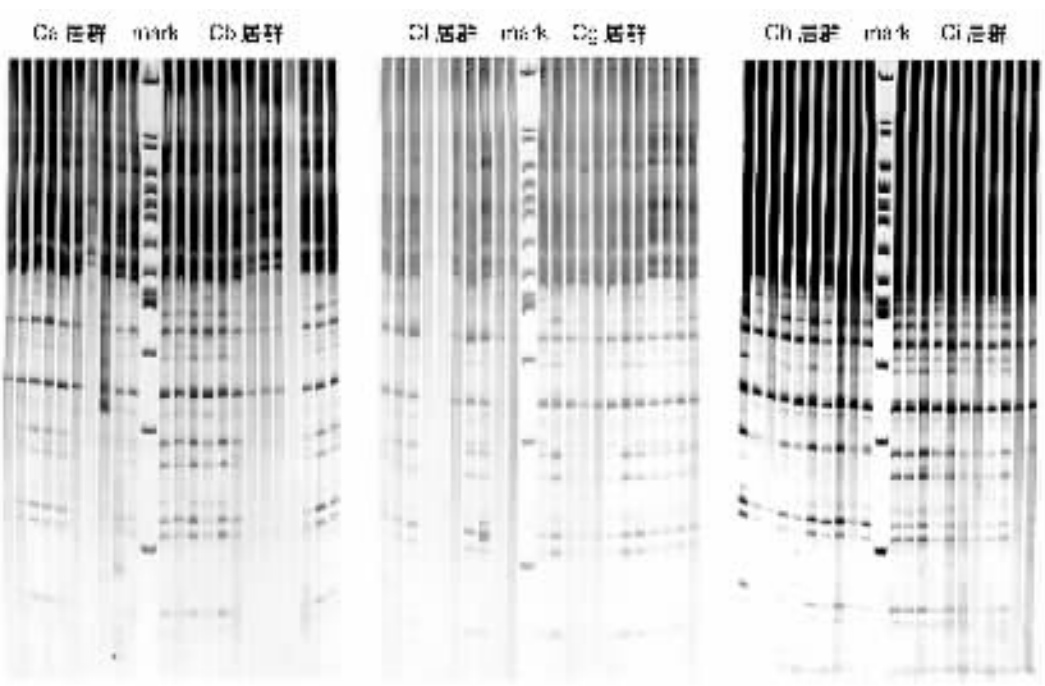


图 1 DALP 引物组合 P_8P_4 对丽江山慈菇 6 居群扩增的 DNA 指纹图谱

Fig. 1 DNA fingerprints of 6 populations of *Iphigenia indica* by using DALP primer group P_8P_4 .

丽江山慈菇 9 个居群平均观察等位基因数 N_a 为 1.4224, 总 N_a 为 1.7939; 平均有效等位基因数 N_e 为 1.3141, 总 N_e 为 1.4810; 平均遗传多样性指数 H 为 0.1745, 总 H 为 0.2831; 平均 Shannon 多样性指数 I 为 0.2527, 总 I 为 0.4231。滇西北居群 Shannon 多样性指数 I 为 0.2484 ~ 0.3202, 滇中居群 I 分别为 0.1560 和 0.1441。滇西北居群的遗传多样性指标均高于滇中居群的 (表 4)。

2.2 遗传分化

表 3 DALP 遗传多态性

Table 3 Analysis of the DALP banding patterns of the 9 populations sampled of *Iphigenia indica*

| 居群 Populations | 样本数 Number of samples | 总条带 Bands | 多态条带 Polymorphic bands | 多态条带比率/% PPB ⁽¹⁾ |
|-------------------|--------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------------|
| 丽江玉龙雪山 (Ca) | 10 | 131 | 68 | 51.91 |
| 大理宾川鸡足山 (Cb) | 10 | 131 | 57 | 43.51 |
| 丽江永胜片角镇 (Cc) | 10 | 131 | 64 | 48.85 |
| 迪庆香格里拉县金沙江东 (Cd) | 10 | 131 | 60 | 45.80 |
| 丽江玉龙县红顶 (Ce) | 10 | 131 | 60 | 45.80 |
| 丽江玉龙县茨科 (Cf) | 10 | 131 | 67 | 51.15 |
| 丽江玉龙县石鼓 (Cg) | 10 | 131 | 54 | 41.22 |
| 昆明小哨乡老五山 (Ch) | 10 | 131 | 35 | 26.72 |
| 昆明安宁笔架山 (Ci) | 10 | 131 | 33 | 25.19 |
| 平均值 Mean | 10 | 131 | 55.3 | 42.21 |
| 总计 Total | 10 | 131 | 104 | 79.39 |

(1) Percentage of polymorphic bands (PPB)

表 4 丽江山慈菇遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of the 9 populations sampled of *Iphigenia indica* Kunth et Benth

| 居群 Populations | $N_a^{(1)}$ | $N_e^{(2)}$ | $H^{(3)}$ | $I^{(4)}$ |
|------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 丽江玉龙雪山 (Ca) | 1.5191 | 1.4049 | 0.2227 | 0.3202 |
| 大理宾川鸡足山 (Cb) | 1.4351 | 1.3450 | 0.1883 | 0.2700 |
| 丽江永胜片角镇 (Cc) | 1.4885 | 1.3980 | 0.2170 | 0.3102 |
| 迪庆香格里拉县金沙江东 (Cd) | 1.4580 | 1.3245 | 0.1802 | 0.2624 |
| 丽江玉龙县红顶 (Ce) | 1.4580 | 1.3022 | 0.1750 | 0.2586 |
| 丽江玉龙县茨科 (Cf) | 1.5115 | 1.3790 | 0.2105 | 0.3051 |
| 丽江玉龙县石鼓 (Cg) | 1.4122 | 1.3119 | 0.1721 | 0.2484 |
| 昆明小哨乡老五山 (Ch) | 1.2672 | 1.1906 | 0.1071 | 0.1560 |
| 昆明安宁笔架山 (Ci) | 1.2519 | 1.1710 | 0.0979 | 0.1441 |
| 平均值 Mean | 1.4224 | 1.3141 | 0.1745 | 0.2528 |
| 总计 Total | 1.7939 | 1.4810 | 0.2831 | 0.4231 |

(1) Observed number of alleles (平均观察等位基因数); (2) Effective number of alleles (平均有效等位基因数); (3) Nei's (1973) gene diversity (遗传多样性指数); (4) Shannon's Information index (Shannon 多样性指数)

表 5 云南丽江山慈菇居群遗传分化分析

Table 5 G_{st} analysis of population genetic differentiation of *Iphigenia indica* from Yunnan

| Species | H_t | H_s | D_{st} | G_{st} |
|-------------------------|--------|--------|----------|----------|
| <i>Iphigenia indica</i> | 0.2831 | 0.1745 | 0.1085 | 0.3834 |

G_{st} : coefficient of gene differentiation (基因遗传分化系数);

H_t : total gene diversity (总基因遗传多样性);

H_s : gene diversity within population (种群基因遗传多样性);

D_{st} : gene diversity among populations (居群间基因多样性)

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 $G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$. 由表 5 可知, 丽江山慈菇总基因多样性 H_t 为 0.2831, 居群内基因多样性 H_s 为 0.1745, 居群间基因分化系数 G_{st} 为 0.3834, 也就是说, 丽江山慈菇有 61.66% 的遗传变异来自居群内,

38.34% 来自居群间, 居群间存在较高水平的遗传分化。

2.3 遗传关系

表 6 为 9 居群的遗传一致度 (Nei's genetic identity) 以及遗传距离 (genetic distance)。金沙江东岸居群 Cd 与金沙江西岸红顶 Ce 之间遗传距离为最小值 0.0539, 而居群 Cd 和居

群 Ce 之间仅有金沙江一江之隔。金沙江西岸红顶居群 Ce 与大理宾川鸡足山居群 Cb 之间遗传距离最大值 0.2229。各居群的 UPGMA 聚类分析见图 2。

表 6 丽江山慈菇 9 居群的遗传一致度以及遗传距离

Table 6 Nei's genetic identity and genetic distance among 9 populations of *Iphigenia indica*

| | Ca (pop1) | Cb (pop2) | Cc (pop3) | Cd (pop4) | Ce (pop5) | Cf (pop6) | Cg (pop7) | Ch (pop8) | Ci (pop9) |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ca | **** | 0.9145 | 0.8883 | 0.8525 | 0.8055 | 0.8437 | 0.8241 | 0.8596 | 0.8315 |
| Cb | 0.0894 | **** | 0.8912 | 0.8304 | 0.8002 | 0.8143 | 0.8186 | 0.8536 | 0.8071 |
| Cc | 0.1184 | 0.1152 | **** | 0.8480 | 0.8275 | 0.8475 | 0.8856 | 0.8676 | 0.8505 |
| Cd | 0.1596 | 0.1858 | 0.1648 | **** | 0.9475 | 0.8763 | 0.8107 | 0.8682 | 0.8405 |
| Ce | 0.2164 | 0.2229 | 0.1894 | 0.0539 | **** | 0.8733 | 0.8075 | 0.8255 | 0.8063 |
| Cf | 0.1700 | 0.2054 | 0.1655 | 0.1321 | 0.1355 | **** | 0.8973 | 0.8767 | 0.8735 |
| Cg | 0.1935 | 0.2002 | 0.1215 | 0.2098 | 0.2139 | 0.1083 | **** | 0.8427 | 0.8584 |
| Ch | 0.1513 | 0.1583 | 0.1420 | 0.1414 | 0.1918 | 0.1316 | 0.1712 | **** | 0.9317 |
| Ci | 0.1845 | 0.2143 | 0.1620 | 0.1738 | 0.2153 | 0.1353 | 0.1527 | 0.0707 | **** |

* Nei's genetic identity (遗传一致度) (above line) and genetic distance (遗传距离) (below line)

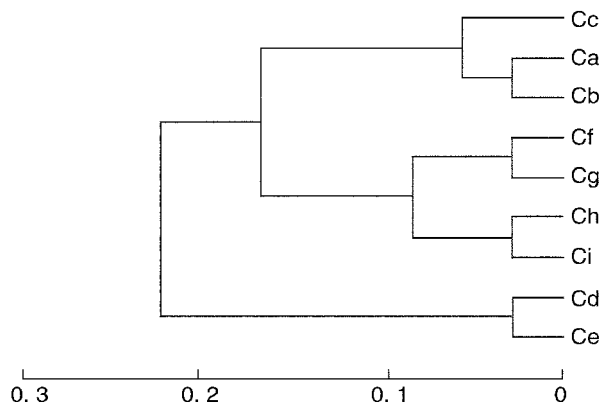


图 2 丽江山慈菇 9 居群 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 9 populations of *Iphigenia indica* by UPGMA

G_{st} 为 0.3834。DALP 分子标记所检测到遗传多样性明显比 RAPD 分子标记检测到的要多。

分析表明，滇西北居群的遗传多样性明显高于滇中居群的遗传多样性。野外调查发现，近十多年来，由于制药厂对丽江山慈菇药材的大规模收购，滇中地区分布的丽江山慈菇遭到大规模的挖掘，滇中地区分布的居群数量和密度急剧减少。这是滇中居群遗传多样性丧失的直接原因。然而，近几年来，滇西北地区的丽江山慈菇也正在遭到掠夺性地采挖。

近年来，野生居群遗传多样性的降低已经成为保护生物学最关注的问题 (Hedrick 等, 1992)，从一个居群或物种的遗传数据可以估算出它的遗传多样性水平、遗传漂变的影响力、遗传分化程度和基因流，了解这些数据是阻止这个居群或者物种灭绝所必须做的第一步工作 (Ellstrand and Elam, 1993)。遗传多样性是物种避免灭绝而长期生存的前提 (Ellstrand and Elam, 1993)，遗传多样性的减少会降低居群在短期和长期两方面的适应环境变化能力 (Hamrick, 1994; Young 等, 1996)。物种的遗传多样性水平制约着物种适应性进化的水平。

3 讨论

RAPD 分析表明，丽江山慈菇居群平均 Shannon 多样性指数 I 为 0.2183，总 I 为 0.2886；总基因多样性 H_t 为 0.1883，居群内基因多样性 H_s 为 0.1498，居群间基因分化系数 G_{st} 为 0.2044 (王海英等, 2004)。而 DALP 分析则是，丽江山慈菇居群平均 Shannon 多样性指数 I 为 0.2527，总 I 为 0.4231；总基因多样性 H_t 为 0.2831，居群内基因多样性 H_s 为 0.1745，居群间基因分化系数

G_{st} 为 0.3834。DALP 分子标记所检测到遗传多样性明显比 RAPD 分子标记检测到的要多。

研究调查表明,滇中地区由于大规模的滥采滥挖,丽江山慈菇野生居群遗传多样性已经急剧下降,如果滇西北地区的丽江山慈菇野生资源继续被掠夺性地采挖下去,其野生居群遗传多样性也会很快丧失,最后将直接导致云南丽江山慈菇这一重要药材资源的枯竭。

〔参 考 文 献〕

- Desmarais E, Lameluc I, Lagnel J, 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species [J]. *Nucleic Acids Res*, **26** (6): 1458—1465
- Dolye JJ, Dolye JL, 1987. A Rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, **19**: 11—15
- Ellstrand NC, Elam DR, 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation [J]. *Annual Review Ecology and System*, **34**: 217—242
- Garcia-Meunier P, Martel C, Pigeot J, et al, 2002. Recent invasion of the Japanese oyster drill along the French Atlantic coast: identification of specific molecular markers that differentiate Japanese, *Ocenebrellus inornatus*, and European, *Ocenebra erinacea*, oyster drills [J]. *Aquatic Living Resources*, **15**: 67—71
- Ha WY, Yau FCF, But PPH, et al, 2001. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates *Panax ginseng* from *P. quinquefolius* [J]. *Planta Med*, **67** (6): 587—589
- Hamrich JL, 1994. Genetic diversity and conservation in tropical forests [A]. In: Drysdale RM, John SET, Yapa A C (eds). Proceedings of the International Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed. : ASEAN-Canada Forest Tree Seed Center Project [C]. Thailand: Muak-Lek, Saraburi, 1—9
- Hedrick RP, McDowell TS, Groff JM, et al, 1992. Isolation and some properties of an Iridovirus-like agent from which sturgeon *Acipenser transmontanus* [J]. *Australian J Bot*, **48**: 101—107
- Langar K, Lorieux M, Desmarais E, et al, 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines [J]. *Theor Appl Genet*, **106**: 1068—1074
- Manske RHF, 1960. The Alkaloids [M]. Academic Press (.inc.ltd). Vol. VI: 247
- Perrot-Minnot MJ, Lagnel J, Desmarais E, et al, 2000a. Isolation and characterization by direct amplification of length polymorphisms (DALP) of codominant genetic markers with Mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) [J]. *Experimental and Applied Acarology*, **24**: 795—803
- Perrot-Minnot MJ, Lagnel J, Migeon A, et al, 2000b. Tracking paternal genes with DALP markers in a pseudoarrhenotodous reproductive system: biparental transmission but haplodiploid-like inheritance in the mite *Neoseiulus californicus* [J]. *Heredity*, **84**: 702—709
- Rama TV, Rao PN, Rao RS, 1987. Somatic chromosome morphology in the genus *Iphigenia* [J]. *Cytologia*, **52**: 439—444
- Rogers SO, Bendich AJ, 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, diversity, barbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, **5**: 69—76
- Wang FZ (汪发绩), Tang J (唐进), 1980. Flora Reipublicae popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, **14**: 63—64
- Wu ZY (吴征镒), Chen SK (陈书坤), Chen J (陈介), 1997. Flora Yunnanica [M]. Beijing: Science Press, **7**: 823—824
- Wang HY (王海英), Yu H (虞泓), Li NG (李南高), et al, 2004. Preliminary analysis on genetic variation of *Iphigenia indica* by RAPD [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **35** (6): 685—688
- Wang R, Wang Y, Lei G, et al, 2003. Genetic differentiation within metapopulations of *euphydryas aurinia* and *Melitaea phoebe* in China [J]. *Biochem Genet*, **41** (3—4): 107—118
- Young A, Boyle T, Brown T, 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants [J]. *Trends Ecology & Evolution*, **11**: 413—418
- Zhou J (周俊), 1977. Study on Chemical Ingredients of *Gloriosa superba* and *Iphigenia indica* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), (2): 62—67