

· 药材 ·

浙江产香茶菜属植物 8个居群的 RAPD分析

方 芳^{1,2}, 郭水良², 黄 华², 毛晓燕², 郭卫东^{2*}

(1. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310028 2. 浙江师范大学生命与环境科学学院, 浙江 金华 321004)

摘 要: 目的 从 DNA 分子水平上探讨香茶菜属植物种群变异特点。方法 从 70 个随机引物中筛选出 10 个具有较高多态性检测能力的引物。用这 10 个随机引物对浙江境内 3 种香茶菜的 8 个居群进行了 RAPD 分析, 对得出的 RAPD 结果应用 SPSS10.0 进行的聚类分析和应用 CANOCO 3.10 进行的除趋势对应分析。结果 共检测出 144 个位点, 其中单态位点 11 个, 占 7.64%, 多态位点 133 个, 占 92.36%。分析结果表明, 浙江产香茶菜不同种、同一种的不同居群间存在明显的遗传分化, 其中种间的差异要大于种内, 大萼香茶菜 *Isodon macrocalyx* 居群间的差异要比香茶菜 *I. amethystoides* 居群的小。结论 香茶菜形态与化学成分的变异有一定的遗传学基础。

关键词: 香茶菜属; 居群; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0553-04

RAPD analysis of eight populations in plants of *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo from Zhejiang Province

FANG Fang^{1,2}, GUO Shui-liang², HUANG Hua², MAO Xiao-yan², GUO Wei-dong²

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China; 2. College of Life and Environment Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract **Object** To study the population variations from plants of *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo at DNA level. **Methods** Eight plant populations of *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo collected from Zhejiang Province were analyzed by RAPD. The results for eight populations from three species of *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo were analyzed by clustering analysis SPSS10.0 and Detrended Correspondence Analysis (DCA) CANOCO 3.10. Ten of the 70 random primers were tested to possess the stronger detecting effect of polymorphous character. **Results** A total of 144 bands was amplified by the 10 primers, 7.64% of the total bands was 11 monomorphic, 92.36% of the total bands was 133 polymorphic. The results indicated that the genetic variations existed within the populations of the same species or the different species in Zhejiang Province, and the variances within the populations of *I. macrocalyx* were slightly smaller than those of *I. amethystoides*. **Conclusion** There are some genetic backgrounds in the variations of the morphology and the chemical compounds in the species of *I. amethystoides*.

Key words *Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo; population; RAPD; genetic diversity

唇形科香茶菜属 [*Isodon* (Schrud. ex Benth.) Kudo] 植物是民间常用的草药^[1], 在我国 24 个省区内广泛分布。该属中富含的二萜类化合物具有抗菌消炎、抗肿瘤、增强机体免疫功能和抗 HIV-1 病毒等活性^[2,3], 因此具有很高的药用价值。目前, 国内外出现了香茶菜属植物研究开发的热潮。

自 20 世纪 90 年代以来, RAPD 技术已被证明是植物遗传多样性研究和系统学研究的一个简便有效的工具, 并被广泛地应用于属下等级的分类及进化等方面的研究^[4,5]。陈林姣等采用 RAPD 技术对溪黄草及其 4 种药用近缘种进行了研究, 为它们的鉴别提供了科学依据并初步探讨了其亲缘关系^[6]。

* 收稿日期: 2002-12-21

基金项目: 浙江省自然科学基金 (301028) 资助项目; 金华市科委计划项目 (2001-1-271) 资助; 浙江省中青年学科带头人基金资助项目

作者简介: 方 芳 (1969-), 女, 浙江省金华市人, 高级实验师, 1991 年毕业于浙江师范大学生物教育专业, 获学士学位, 1991 年至今, 在浙江师范大学生命与环境科学学院工作, 2000 年至今为浙江大学生命科学学院在读硕士生, 研究方向为药用植物学, 植物生理学等, 曾参加和主持浙江省自然科学基金项目等 8 项, 发表论文 10 多篇。

Tel (0579) 2282269 (0) E-mail: sky85@mail.jznu.net.cn

香茶菜居群的形态变异很大^[7-9],陈玉俊等发现浙江省不同产地的香茶菜地下部分中二萜类含量明显不同^[10],并且在胃复春片(其主要组成是香茶菜)中发现不同形态和来源的香茶菜,其有效成分存在差异。但是,目前尚不知形态与植物成分上的差异是否有遗传学基础。本实验采用 RAPD 技术分析浙江境内 3 种香茶菜及同一种内不同居群间的遗传多态性和遗传关系,旨在揭示香茶菜种下遗传变异特点,从而为筛选有遗传基础的高二萜类含量香茶菜居群提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料:实验所用材料于 2001-05-2002-06 月从浙江省不同野生居群移植于浙江师范大学苗圃内栽培所得,并由浙江师范大学生命与环境科学学院郭水良博士鉴定,材料名称及来源见表 1。从每一个居群的多个个体中选取新鲜幼叶提取总 DNA。

表 1 香茶菜居群及其来源

Table 1 Populations and their resources in plants of <i>Isodon</i> (Schrad. ex Benth.) Kudo		
编号	种类	居群来源
1	大萼香茶菜 <i>Isodon macrocalyx</i>	金华北山
2	大萼香茶菜 <i>I. macrocalyx</i>	临安西天目山
3	显脉香茶菜 <i>I. nervosa</i>	金华南山
4	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	金华北山
5	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	金华南山
6	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	台州三门
7	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	温州雁荡山
8	香茶菜 <i>I. amethystoides</i>	丽水白云山

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取:DNA 提取方法参考 SDS 法,并修改,方法如下: (1)分别用清水和蒸馏水将叶片洗净,用无菌吸水纸吸干; (2)称取 0.3~1.0 g 叶片,剪碎后在液氮中迅速研磨成细粉末状,分装至 1.5 mL 离心管中; (3)加入 600 μ L 的 SDS 提取液 (100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50 mmol/L EDTA pH8.0, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L β -巯基乙醇, 3% SDS), 匀浆器上振荡混匀, 65℃ 水浴保温 30 min; (4)置冰上,加入等体积 5 mol/L 醋酸钾,冰浴 30 min, 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min; (5)将上清液转入新离心管中,加 0.6 倍体积异丙醇,混匀后置冰上 10 min, 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min; (6)弃去上清液,沉淀溶于 500 μ L 的 TE 缓冲液中,常温下静置 20 min 左右; (7)加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1), 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min; (8)取上层水相,用 50 μ L 的 10 mg/mL

RNaseA 在 37℃ 下消化 30 min 以除去 RNA; (9)加等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 再抽提 1 次;取上层水相加 0.6 倍体积异丙醇,轻轻混匀后,室温放置 10~15 min; (10) 4℃ 条件下, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液,可见离心管底部有微量白色沉淀,加 500 μ L 预冷的 70% 乙醇洗 2 次后,室温干燥; (11)溶于 100 μ L 的 TE 中,低温 (-20℃) 保存备用。

1.2.2 DNA 纯度和质量的检测:总 DNA 的纯度和质量的检验采用琼脂糖凝胶电泳检验和紫外吸收检验。在 Ultrospec 4000 全自动紫外可见分光光度计上,测定提取的总 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 值;以 A_{260}/A_{280} 值估测其纯度。同时用 0.8% 琼脂糖凝胶 (EB 0.5 μ g/mL) 电泳,也可以测定 DNA 样品的纯度。

1.2.3 引物及其筛选:本实验所用的引物购自上海生工生物工程公司,一共 70 个引物,分别记为 S40~S50, S301~S360。任取一个模板,对所有引物进行 PCR 扩增,根据扩增条带数的多少对引物作初步筛选。筛选的原则是扩增条带数多且条带清晰的引物。

1.2.4 扩增反应:以所提 DNA 为模板,10 碱基的寡核苷酸为引物,在 Hybrid PCR Express 热循环仪上进行 RAPD 扩增。反应体系 (25 μ L) 包括模板 DNA 1 μ L (约 30~50 ng); 2 mmol/L MgCl₂; 400 μ mol/L dNTP; 引物 30 ng; Taq 酶 1 U。PCR 反应缓冲液, dNTP 及 Taq 酶均为上海生工生物工程公司产品。

扩增程序:94℃ 预变性 5 min; PCR 循环 40 次,每循环 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min; 最后 72℃ 延伸 7 min。

PCR 结果检测:PCR 产物用含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭 (EB) 的 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检验。以 $\times$ TBE 为电极缓冲液,电压为 4 V/cm,稳压电泳 2 h。电泳结果在紫外透射仪上观察、记录、拍照。照相机配红色滤光片。

1.3 数据处理:每个 PCR 扩增反应重复一次以上,选取可重复的 DNA 带 (包括强带和弱带) 记录。每个样品的扩增带按“有”或“无”记录。“有”赋值为 1, “无”赋值为 0。在 SPSS10.0 软件中,采用 sokal-sneath 1 作为居群间遗传分化的相似系数,计算居群间遗传相似程度,以此为基础,用最近邻体法对 8 个居群聚类分析,根据聚类图特点,分析居群遗传分化特点。同时应用除趋势对应分析 (Dedentred Correspondence Analysis) 比较 8 个居群在遗传组成上的相似关系,进行除趋势对应分析时,应用了 CANOCO3.10 和 CANODRAW 3.0 软件。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的纯度和质量的检测: DNA 紫外分光光度计测定的结果可见 8 个 DNA 样本 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0, 均可用做 RAPD 分析。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对 8 个 DNA 样本进行检测, RNA 被完全降解, DNA 呈一亮带, 很少降解。

2.2 RAPD 扩增结果: 对 70 个随机引物 (10 个核苷酸长) 进行扩增, 有 25 个引物有扩增产物产生, 其多态性随引物的不同而表现出差异。从中筛选出 10 个能够产生清晰并呈现多态性条带的引物, 用以对 8 份材料进行 RAPD 扩增, 并对这 10 个引物的扩增结果进行统计分析 (表 2)。在供试材料中共获得 144 条扩增产物, 引物的扩增带数在 8~24 条, 平均每个引物扩增的 DNA 带数为 14.4 条; 其中 133 条带具有遗传多态性, 约占总数的 92.36%, 每个引物可扩增的多态带不等, 从 8~24 条变化, 平均为 13.3 条。对大萼香茶菜和香茶菜两个种内的不同居群分别进行统计, 结果见表 3。大萼香茶菜两个居群共扩增出 93 条 DNA 带, 其中 44 条为多态性带, 占 47.31%。香茶菜 5 个居群共扩增出 125 条 DNA 带, 多态性带占 76.80%。表 3 统计结果还表明, 浙江产 3 种香茶菜的 5 个居群多态性带占总数的 76.80%。这表明不同品种的香茶菜和同一种内不同居群的香茶菜之间都存在较高的多态性, 遗传变异较大。图 1 为 S43 和 S339 两个引物对 8 个不同样本的扩增结果。由图 1 可见, 产生的 DNA 片段主要分布在 0.941~4.973 kbp 区域, 少数片段小于 0.941 kbp。

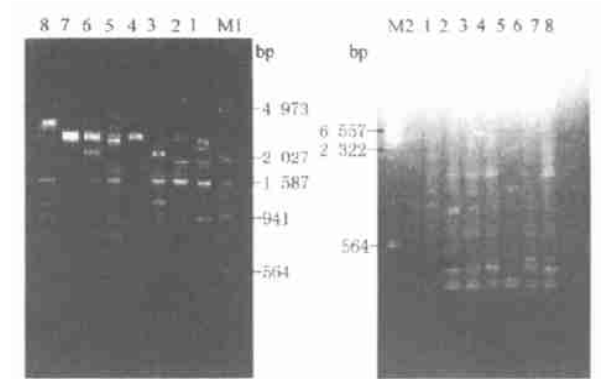
表 2 香茶菜 RAPD 所用的引物及其扩增结果

Table 2 Primers used for RAPD and amplified bands of <i>Isodon</i> (Schrad. ex Benth.) Kudo				
引物	序列 (5'→3')	扩增带数	多态带数	多态性带数 %
S43	GT CGC CGTCA	16	15	93.75
S44	TCT GGT GAGG	17	16	94.12
S45	TGAGCGGACA	13	12	92.31
S48	GTGTGCCCCA	20	20	100.00
S301	CTGGGCACGA	9	7	77.78
S313	ACGGGAGCAA	9	8	88.89
S317	GACACGGACC	12	9	75.00
S328	GGGTGGGTAA	8	7	87.50
S337	CCTTCCCACT	24	24	100.00
S339	GTGCAGACAA	16	15	93.75
总和		144	133	
平均数		14.4	13.3	92.36

2.3 香茶菜的聚类分析: 居群间的 RAPD 片段 (即遗传相似度) 能够在一定程度上反映居群间 DNA

表 3 大萼香茶菜 2 个居群 香茶菜 5 个居群的遗传多样性比较
Table 3 Comparison of genetic diversity between two populations of *I. macrocalyx* and five populations of *I. amethystoides* based on their RAPD data

引物	大萼香茶菜 2 个居群			香茶菜 5 个居群		
	扩增带数	多态性带数	多态性带数 %	扩增带数	多态性带数	多态性带数 %
S43	11	3	27.27	14	13	92.86
S44	9	5	55.56	13	12	92.31
S45	9	6	66.67	11	8	72.73
S48	14	7	50.00	17	15	88.24
S301	6	3	50.00	8	5	62.50
S313	4	1	25.00	8	5	62.50
S317	9	2	22.22	10	5	50.00
S328	5	2	40.00	7	4	57.14
S337	19	11	57.89	21	20	95.24
S339	7	4	57.14	16	9	56.25
总数	93	44		125	96	
平均数	9.3	4.4	47.31	12.5	9.6	76.80



材料编号见表 1; M1 为 Lambda DNA/EcoRI + Hind III 标准相对分子质量; M2 为 Lambda DNA/Hind III 标准相对分子质量
Samples 1~8 were listed in Table 1; M1 is standard molecular weight of Lambda DNA/EcoRI + Hind III; M2 is standard molecular weight of Lambda DNA/Hind III

图 1 由 S43 (A) 和 S339 (B) 扩增产生的 RAPD 带型
Fig. 1 RAPD bands amplified by S43 (A) and S339 (B) 的差异。根据每个引物对 3 种香茶菜 8 个居群的基因组的 DNA 扩增结果, 编码后采用 sokal sneath 1 作为居群间的遗传相似度值, 聚类策略采用最近邻体法, 结果见图 2。基于 RAPD 分析所获得的数据, 应用除趋势对应分析 (DCA), 对 8 个居群进行排序得到图 3。图 3 也同样反映出 8 个居群在遗传上有明显的分化, 与大萼香茶菜相比, 香茶菜居群间的遗传差异明显大一些。

3 讨论

除趋势对应分析 (DCA) 作为一种成熟的生态学多元统计分析方法, 在生态学上得到了广泛地应

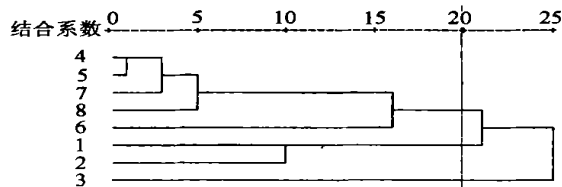


图 2 中的 8 个居群见表 1

Above populations 1-8 were listed in Table 1

图 2 基于 RAPD 分析数据的香茶菜属 8 个居群遗传分化聚类图

Fig. 2 Cluster dendrogram revealing genetic differentiation among eight populations of *Isodon* (Schrader ex Benth.) Kudo based on RAPD data

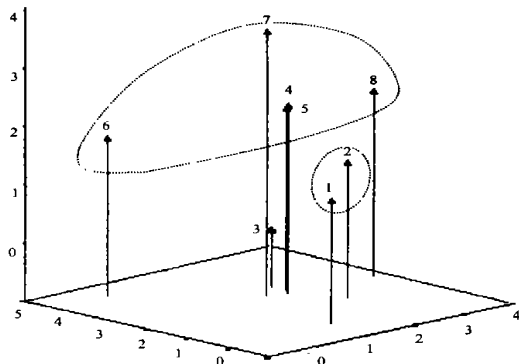


图 3 中的 8 个居群见表 1

above populations 1-8 were listed in Table 1

图 3 基于 RAPD 数据的香茶菜属 8 个居群遗传分化 DCA 排序图

Fig. 3 DCA ordination of genetic differentiation among eight populations of *Isodon* (Schrader ex Benth.) Kudo based on RAPD data

用,该方法的目的在于将对象间的相似关系应用二维、三维图加以表达。与主成分分析方法相比,DCA 排序更适用于非线性数据。其次,DCA 的特点在于应用连续的观点反映对象的差异。事实上,居群间的遗传分化并非明显地间断,特别是这种分化与地理梯度连续在一起时,群体的差异多数表现出连续性,而传统的聚类分析以间断的形式表现出居群间的差异,这并不完全符合客观实际。从研究结果分析,采用排序也能够较客观地反映出居群间的遗传分化,相信这一方法会在药用植物遗传分化的研究中被广泛地应用。

RAPD 分析结果还表明,不同产地的香茶菜属居群存在明显的遗传分化,当结合系数在 20 时,8 个居群可分成 3 类:Ⅰ {4, 5, 6, 7, 8} Ⅱ {1, 2} 和Ⅲ {3},正好与传统的分类结果相吻合,分别属于香茶菜、大萼香茶菜和显脉香茶菜。从聚类分析的结果可以估计香茶菜、大萼香茶菜和显脉香茶菜 3 个种之间的亲缘关系。大萼香茶菜与香茶菜之间的距离要

比显脉香茶菜到香茶菜的距离小。从植物体的叶形、根状茎特点等方面,大萼香茶菜与香茶菜更为接近,但在传统的分类上,香茶菜与显脉香茶菜属于香茶菜组 (Sect. *Amethystoides*),而大萼香茶菜属于皱叶香茶菜组 (Sect. *Rabdosia*)。而本研究的 RAPD 结果表明,大萼香茶菜与香茶菜在遗传上更为相近。关于这 3 个种的亲缘关系,需要作更深入的研究。

香茶菜的 5 个居群间存在一定的遗传分化。聚类图上 4, 5, 6, 7, 8 居群中,其中 4 号居群和 5 号居群分别产自金华的北山和南山,地理上最近,气候基本一致,这两个居群间的差异最小。6, 7, 8 号居群产自台州三门、温州雁荡山和丽水白云山,地理位置相对较远,这 3 个居群在遗传上的距离也大一些。在聚类图上,香茶菜 5 个居群的结合系数大于 15,而 1, 2 两个金华北山和临安西天目山的大萼香茶菜居群结合系数在 10 左右。由此可见,香茶菜在居群水平上的遗传分化程度要比大萼香茶菜大一些,香茶菜在植物体形态、二萜类含量上的差异,很有可能具有遗传学基础,特别是台州三门产香茶菜与其他地区的香茶菜居群遗传上有较大的差异,将来的工作将进一步了解台州三门产香茶菜居群的形态特点和二萜类含量情况。

References

- [1] Fang Y Y. *Flora of Zhejiang* (浙江植物志) [M]. Tomus 5, Tomus 6. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 1989.
- [2] Sun H D, XU Y L, Jiang B. Diterpenoids from *Isodon* species (香茶菜属植物二萜化合物) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [3] Gui M Y, Jin Y R, Wang B Z. Studies on chemical constituents of *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1999, 34(8): 516-518.
- [4] Zhou Y P, Ge S, Wang X D. *The Molecular Marker among Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [5] Shi S H, Tang S Q, Chen Y Q, et al. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Phytotaxonomica Sin* (植物分类学报), 1998, 36(4): 317-322.
- [6] Chen L J, Chen Y Q, Qu L H, et al. RAPD analysis on Chinese medicine Xihuangcao and its related species [J]. *Acta J Sun Yat-Sen Univ Nat Sci* (中山大学学报·自然科学版), 1999, 38(1): 102-106.
- [7] Wang Z Y, Chen D C, Chen Z L, et al. Variation of *Rabdosia eriocalyx* and its ecological chemistry [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 30(5): 528-533.
- [8] Feng Y X, Song W Z, Chen H. Leaf SEM observation and identification of twelve *Rabdosia* species [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1991, 26(3): 147-151.
- [9] Li H W. Taxonomic review of *Isodon* (Labiateae) [J]. *J Arnold Arboretum*, 1998, 69: 289-400.
- [10] Chen Y J, XU M J, GU W. Quantitative determination of diterpenoids of radical in *Rabdosia amethystoides* from various areas [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(4): 294.