

RAPD 在山麦冬属四种植物分类中的应用[△]

中国药科大学生药学研究室(南京 210038)

吴 强* 王义权

余伯阳

徐珞珊

南京师范大学生物系

周开亚

摘 要 采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对山麦冬属的 4 种植物进行研究,并以沿阶草 *Ophiopogon bodinieri* Lévl. 为组外比较,用 SPSS 3.1⁺ 软件对实验数据进行统计分析,得到聚类图。观察所得结果,发现这 5 种植物被分为两大类群,短葶山麦冬、阔叶山麦冬、山麦冬、湖北山麦冬为一类,沿阶草为另一类,这与经典分类相一致,前 4 种隶属于山麦冬属,后一种属于沿阶草属;同时,我们发现短葶山麦冬和阔叶山麦冬相对遗传距离较近,结果为阔叶山麦冬是短葶山麦冬的阔叶变种提供分子遗传方面的佐证。

关键词 DAPD 山麦冬属 湖北麦冬 山麦冬 阔叶山麦冬 短葶山麦冬

山麦冬属植物属于百合科沿阶草族,多具药用。近年来,对山麦冬类药材的药效学研究,发现它们在心血管、免疫系统方面有较好的作用,其中湖北山麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma 和短葶山麦冬 *L. muscari* (Decne.) Bailey 为《中国药典》1995 年版新增品种山麦冬的原植物。但对湖北麦冬是否为山麦冬的变种,阔叶山麦冬和短葶山麦冬是否应合并为一个种,前者为后者的变种或为两个种,一直有较大分歧。山麦冬与阔叶山麦冬化学成分分别与湖北麦冬、短葶山麦冬区别不大。为了更好地开发利用山麦冬属植物的药用资源,我们采用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术对这 4 种植物进行了分类学研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

a)湖北麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) var. *prolifera* Y. T. Ma 湖北省襄樊。

b)山麦冬 *L. spicata* (Thunb.) Lour. 中国药科大学校园。

c)阔叶山麦冬 *L. platyphylla* Wang et Tang 江苏句容宝华山。

d)短葶山麦冬 *L. muscari* (Decne.) Bailey 福建省泉州。

e)沿阶草 *Ophiopogon bodinieri* Lévl. 湖北省襄樊。

a、c、d、e 现栽培于中国药科大学植物园,沿阶草为外群组。

1.2 DNA 分离:DNA 提取分离参见文献^[3]。取 2.5 g 新鲜叶片在液氮中研成粉末,放入 15 mL 离心管中,加入 5 mL DNA 提取缓冲液(8 mol/L 脲,0.35 mol/L NaCl,0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.00,0.02 mol/L Na₂EDTA,2%蔗糖,5%酚),用玻璃棒搅匀,加入 1.5 mL 10%SDS,倒转离心管数次,使之混匀,60 ℃保温 10 min,其间倒转离心管数次。加 2 mL 酚,3 mL 氯仿-异戊醇(24:1),倒转离心管数次,使之成为乳状液,60 ℃保温 15 min,离心分相,吸取上清液。向上清液中加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),混匀,离心,吸取上清液(重复此步骤,至上下相间无沉淀物)。向上清液中加入 2/3 体积异丙醇,用玻璃棒绕出沉淀 DNA。用 70%的乙醇洗涤两次,抽干,放入 15 mL 离心管中,加入

* Address: Wu Tao, Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing

[△]霍英东教育基金资助项目

0.4 mL TE, 4 °C 溶解 2 d, 即可作 RAPD 反应模板。

1.3 引物: 本实验使用的引物是浙江农业大学出口的 G 组 20 个随机引物, 每个引物长度为 10 个核苷酸。

1.4 RAPD 反应条件: 扩增总体积 30 μ L, 其中 3 μ L 10 $\times$ Buffer, Mg^{2+} 45 mmol, 4 种核苷酸 4.75 mmol, 引物 16.5 ng, 100 ng 的基因组 DNA, Promega 公司产 Taq 酶 1 单位。

首先, 97 °C 预变性 7 min, 然后在 1190 型电脑自动基因扩增仪(北京新技术研究所产)上, 94 °C 变性 80 s, 36 °C 退火 100 s, 72 °C 延伸 160 s, 40 个循环。72 °C 延伸 7 min。

扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并照相。

1.5 在反应中, 模板浓度, Mg^{2+} 浓度对带型有较大影响, 因此, 我们对所选的 8 个引物的扩增效果进行了考察, 结果显示所选引物在模板浓度 1.2~3.5 ng/ μ L, Mg^{2+} 浓度 0.75~2.25 mmol/ μ L 的范围扩增效果良好。

1.6 数据分析: 电泳图谱中的每一条带(DNA 片段)均为一个分子标记, 并代表一个引物结合位点, 根据各分子标记的迁移率及其有或无, 统计得所有位点的二元数据: 有带(显性), 弱带或强带均计为 1, 无带(隐性)计为 0。

任意两个个体间遗传距离(P), 根据两个个体的共享 RAPD 标记计算^[4]:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$$P = 1 - F$$

F 为共享度, N_x 、 N_y 分别为第 x 和 y 个体拥有的 RAPD 标记数, N_{xy} 为 x 和 y 个体共享的 RAPD 标记数。

采用 SPSS 3.1⁺ 软件中的 BAVERAGE 和 WAYERAGE 聚类方法统计所有位点的二元数据, 建立种系发生图。

2 结果

2.1 在所采用的 G 组 20 个引物中, 筛选出 8 个引物在所有个体中得到良好的结果, 图 1 列举了 G12、G13 两种引物扩增产物的电泳

图谱(图 1)。

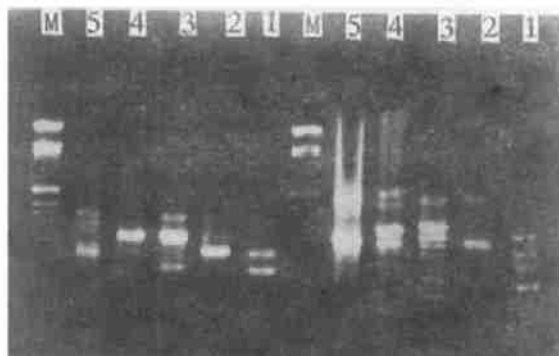


图 1 引物 G-13、G-12 对不同种样品的扩增图谱

M 为 Marker 1-湖北麦冬 2-山麦冬 3-阔叶山麦冬 4-短茅山麦冬 5-沿阶草

各引物产生的标记数在 1~9 之间, 共记录了 175 个结合位点数, 其中 150 个是多态标记(表 1)。

表 1 引物及其扩增情况

引物	序列 5'→3'	位点数	
		总数	多态标记数
G02	GGCACTGAGG	18	13
G04	AGCGTGTCTG	13	8
G06	GTGCCTAACC	24	19
G10	AGGGCCGTCT	20	20
G12	CAGCTCACGA	32	32
G13	CTCTCCGCCA	14	14
G16	AGCGTCCTCC	29	19
G18	GGCTCATGTG	25	25

2.2 RAPD 技术显示了较好的分辨率, 所有 8 个引物的扩增带型均有变化, 能很好地区别这 5 种植物。

2.3 从这 5 种植物共享的 RAPD 标记数, 得出遗传距离(表 2)数据矩阵图。对角线上的数字(下划线)标出, 表示每种植物检测到的 RAPD 标记数。对角线以下数据为遗传距离。对角线以上的数据为共享带数/非共享带数。我们采用 SPSS 3.1⁺ 软件中的两种方法对所得二元数据进行统计分析, 这两种方法得出结果是一致的(图 2)。

表 2 5 种植物的遗传距离(P $\times$ 100)

	1	2	3	4	5
1	28	11/13	16/37	16/31	11/51
2	58.49	25	17/32	15/30	15/40
3	53.62	48.48	41	23/30	22/42
4	49.20	50.00	39.47	35	17/46
5	69.86	57.14	48.83	57.5	45

1-湖北麦冬 2-山麦冬 3-阔叶山麦冬
4-短茅山麦冬 5-沿阶草

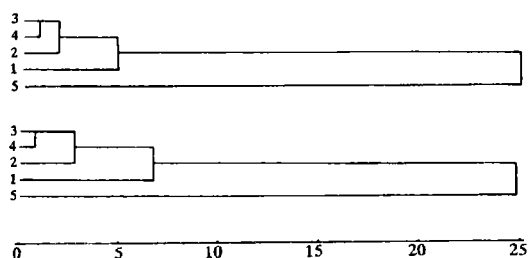


图2 利用 SPSS 3.1+建立的种系发生图

上为组间平均法 下为组内平均法

1-湖北麦冬 2-山麦冬 3-阔叶山麦冬 4-短葶山麦冬 5-沿阶草

3 讨论

3.1 从聚类图中,可以看出全部 5 个类群被归入两大类,湖北麦冬、山麦冬、阔叶山麦冬、短葶山麦冬属于一类,沿阶草属于另一类,与经典分类学对这 5 种植物的划分相一致,湖北麦冬、山麦冬、阔叶山麦冬、短葶山麦冬为山麦冬属植物,沿阶草为沿阶草属植物。

3.2 地下走茎的有无反映了不同的繁殖方式,湖北麦冬、山麦冬具有地下走茎,而阔叶山麦冬、短葶山麦冬无,在聚类图上表现为前两种与后两种遗传距离较大。

3.3 湖北麦冬与山麦冬的区别仅在于湖北麦冬花后长芽,而余伯阳观察了这两种植物的块根和叶的组织形态,发现这两者之间无明显差异,因此认为湖北麦冬的分类学位置有待进一步研究^[1];从聚类图和遗传距离数据矩阵上,发现湖北麦冬与山麦冬的相对遗传距离大于山麦冬与阔叶山麦冬的相对遗传距离。对湖北麦冬连续 3 年的观察,发现湖北麦冬均未结果,这说明它不能进行有性繁殖。综合上述现象,湖北麦冬与山麦冬似可推测为两个种,更深入的研究正在进行。

3.4 短葶山麦冬与阔叶山麦冬的区别主要在于叶片宽度、花序长短程度、花葶是否高于

叶。短葶山麦冬花葶通常短于叶,花序较短,叶狭;阔叶山麦冬花葶通常长于叶,花序较长,叶片较宽。《浙江植物志》采用日本学者原宽的意见,认为中间类型的存在给鉴定带来一定的困难,所以建议合并这两种植物;徐炳声等利用图表、指数等方法探讨短葶山麦冬种群分类问题,他以叶宽、花葶是否高于叶、花序长、叶长为指标,比较 64 份短葶山麦冬和阔叶山麦冬标本,定量测定性状的数量变异和性状相关性的数量变异,认为这两者之间没有截然界限,但是存在一定的倾向性,认为阔叶山麦冬是短葶山麦冬的阔叶变种^[2];余伯阳发现这两种植物的叶下表皮细胞有明显区别,短葶山麦冬的叶下表皮细胞有 1~3 个条状突起、呈沟状、波状、分枝状;阔叶山麦冬的叶下表皮细胞光滑^[1]。从聚类图和遗传距离数据矩阵中可以看出这两种植物相对遗传距离较近,表明它们具有较近的亲缘关系,综上所述,我们支持徐炳声的观点,阔叶山麦冬不应为独立的种,而应为短葶山麦冬的阔叶变种。

致谢:中国科学院北京植物研究所陈心启研究员鉴定部分植物标本;湖北省中医药研究院中药研究所王克勤副研究员,襄樊药材站马本敏先生、方玉友先生在采集过程中,给予我大力帮助,在此致以衷心的感谢。

参考文献

- 1 余伯阳. 麦冬的生药学研究,中国药科大学博士论文
- 2 徐炳声,等. 植物分类学报,1981,19(4):456
- 3 张中廷,等. 遗传学报,1994,21(5):373
- 4 Nei M, et al. Proc Nat Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269

(1997-01-17 收稿)

Classification of Four Species of Plant Genus *Liriope* (*Liriope* Lour.) Using RAPD

Wu Tao, Wang Yiquan, Yu Boyang, et al (Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038)

Abstract Four species of *Liriope* Lour. genus were studied by means of Randomized amplification of polymorphous DNA (RAPD) technique, with *Ophiopogon bodinieri* Levl. as the outgroup reference. Analysis of the experimental data with the aid of SPSS 3.1 revealed that the 5 plants can be classified into two genus as

was done in the classical classification, i. e. *L. spicata* (Thunb.) Lour., *L. spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma, *L. platyphylla* Wang et Tang and *L. muscari* (Decne) Bailey belong to genus *L. Lour.*, while *O. bodinieri* Levl. belongs to genus *O. Ker-Gawl.* It was also found that *L. Platyphylla* was more genetically related to *L. muscari*, providing the evidence that it is a broad-leaf variety of *L. muscari* (Decne) Bailey.

Key Words RAPD *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. *L. spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma *L. platyphylla* Wang et Tang *L. muscari* (Decne) Bailey *L. Lour.*

川南马兜铃野生变家种初步研究

四川省医药学校(峨眉山市 614201) 杨桢禄*

摘要 简述了川南马兜铃的生态习性和生物学特性,初步研究了野生变家种的栽培技术,为开发利用和保护这一野生药用植物资源提供了依据。

关键词 川南马兜铃 野生植物 栽培技术 开发利用 繁殖方式 资源

川南马兜铃 *Aristolochia austrozechuanica* Chten et Cheng ex Cheng et Wu, 又名大叶马兜铃,块根入药,名曰大叶青木香,又名宜宾防己^[1],《四川中药志》称防己^[2]。属于马兜铃科 (*Aristolochiaceae*) 马兜铃属 (*Aristolochia*) 植物^[3,4]。马兜铃属植物共 400 多种,广布于热带、亚热带和温热带地区,我国约有 50 余种,多集中于秦岭以南,尤以西南、华南各省区为盛。四川产 18 种 1 变种和 1 变型,多生山地、林间。川南马兜铃分布于四川省的南川、江津、古蔺、珙县、筠连、兴文、马边、峨眉和贵州省的习水、遵义等地。性味苦、凉,具有行气止痛、排脓消炎、利水消肿、祛风除湿之功效,常用于治疗脘腹胀痛、骨关节结核、慢性骨髓炎,蛇咬伤等症。经成分初步研究分析得到马兜铃酸 (aristolochi acid),对腺癌 755 有较好的抑制作用;尿囊素 (allantoin),有促进溃疡的伤口愈合及新肌肉生长的作用。另外还含有生物碱等^[5]。本植物全体密被锈色长绒毛,叶心圆形,革质;花形奇特、花被大型,可供观赏。未见栽培报道,特别是扦插

繁殖更未见报告。笔者介绍该植物野生变家种的栽培技术,以便为其开发利用提供依据。

川南马兜铃主要为野生,罕有药农栽培。我校自 1978 年从古蔺引种以来,生长旺盛,发育良好,花开于老茎或叶腋,但 10 多年来从未见结果。故于 1989 年后笔者对其进行了扦插繁殖试验,结果表明此法完全可行。

1 生态习性

川南马兜铃多喜生于冬暖夏凉、湿润肥沃、富含腐殖质,海拔 750~2000 m 之间的中低山地和林间。

2 生物学特性

2.1 性状特征:川南马兜铃为木质藤本,长可达 5~6 m,全体密被锈褐色毛茸。根柱状常膨大成不规则的块状或串珠状,直径 3~10 cm,表面粗糙,灰棕色,具不规则的皱纹或小圆状突起。纵剖切面淡黄白色,有异型维管束散在,粉质,根中央有石细胞。气无,味微涩。茎圆柱形,分枝,幼时密被棕色绒毛,老时脱落,表面有纵向沟槽。单叶互生,革质,心圆形,全缘,长 8~20 cm,宽 9~22 cm,被锈色

* Address: Yang Zhenlu, Sichuan Pharmaceutical school, Emeishan

杨桢禄 男,1965 年毕业于重庆师范学院,后又就读于四川医学院和北京医学院,现任药用植物学高级讲师,主要从事药用植物学及其资源等教学、科研,已完成《四川植物志》马兜铃科的编写,国家七五攻关项目中秦皮、葛蒲、牙皂等课题的资源调查整理。主编及参编了《药用植物学》、《四川珍稀濒危植物》、《中国本草图录》等著。发表论文近 30 篇,命名药用植物新种 10 多种,先后获省、市科技进步二、三等奖 2 项。