其芦荟素显色反应都位于维管束的大型薄壁细胞内,后者是芦荟素的主要贮存场所[7]。

我们对木立芦荟不同叶龄叶的比较解剖观察结果表明,它们都由表皮、同化组织、储水组织和维管束构成,其主要区别是维管束中大型薄壁细胞的大小不同。植株上部的幼叶和成熟叶的维管束中,大型薄壁细胞体积大;而植株下部老叶的维管束,其大型薄壁细胞已萎缩,细胞体积小。因此,大型薄壁细胞占维管束横切面的百分比从上到下随着叶龄的增大而减少。高效液相色谱测定结果表明,在同一株植物中,木立芦荟从上到下随着叶龄的增大,其芦荟素的含量逐渐降低。上述结果与 Chauser等对木立芦荟和海莱芦荟 *A. hereroensis* 的研究结果一致[9~10],也与沈宗根等对中华芦荟的研究结果相同[7],沈宗根等的研究结果还指出,中华芦荟植株从上而下不同叶龄的叶中,其维管束的密度幼叶高,老叶低。结合我们对木立芦荟同株上自上而下 13片叶结构的比较解剖研究结果分析,木立芦荟从上到下不同叶龄叶内芦荟素含量逐渐降低的原因可能与其贮存芦荟素的结构—— 韧皮部内大型薄壁细胞 (也称芦荟素细胞) 逐渐萎缩变小,以及单位面积内维管束数量逐渐减少,从而芦荟素的贮存总面积减少有密切关系。关于黄海鸥在其书中叙述的芦荟从上到下随叶龄增大芦荟素的含量的逐渐增高[11],未见其文献引证和原因分析,难以令人置信。根据以上研究结果分析,木立芦荟植株上部的幼叶虽然芦荟素含量高,但叶片小,总生物产量少,而下部老叶则芦荟素含量低。因此,中部的成熟叶芦荟素含量较高,生物产量大,为最佳采收部位。

致谢: 芦荟素含量的测定是在孙文基教授的指导下,由尚平工程师协助在西北大学生物医药省重点实验室完成的,并得到李多伟副教授的帮助。

参考文献:

[1] Takayuki S, Toshifumi H. The efficacy of the *Aloe* plants, chemical constituents and biological activities [J]. Cosmetic Toiletries, 1983, 98: 105-108.

[2] Reynolds T. The compounds in *Aloe* leaf exudates: a review [J]. Bot J Linn Soc, 1985, 90: 157-177.

[3] Roynolds T, Nicholls E. An examination of phytochemical variation in *Aloe elgonica* Bullock [J]. Bot J Linn Soc, 1986, 92: 393-397.

[4] Groom Q J, Reynolds T. Barbalion in *Aloe* species. Barbalion in *Aloe* species [J]. Planta Med, 1987, 53: 345-348.

[5] 高秀英. 中华芦荟中多糖的研究 [J]. 植物学报, 1989, 31: 389-392.

[6] Yamamoto M, Masui T, Sugiyama K, *et al*. Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller [J]. J Agri Bio Chem, 1991, 55: 1627-1629.

[7] 沈宗根, Elena C, Yitzchak G, *et al*. Anatomy, Histochemistry and phytochemistry of leaves in *Aloe vera* var. *chiensis* [J]. Acta Bot Sin, 2001, 43: 780-787.

[8] 胡正海,沈宗根,李景原. 芦荟属植物叶的结构与蒽醌类物质的关系 [J]. 中草药, 2001, 23 (4): 347-350.

[9] Chauser Volfson E, Gutterman Y. Content distribution of the secondary phenolic compound homonatalion in *Aloe hereroensis* leaves according to leaf part, position and monthly changes [J]. J Arid Environments, 1997, 37: 115-122.

[10] Chauser Volfson E, Gutterman Y. The barbaloin content and distribution in *Aloe arborescens* leaves according to leaf part, age, position and season [J]. Israel J Plant Sci, 1996, 44: 289-296.

[11] 黄海鸥. 芦荟的开发和奇效 [M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2000.

[12] 李正理. 植物组织制片学 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1996.

四川麦冬自然居群间 RAPD分析

徐 柯,郑 鸣,曹 毅,蒋 彦,乔代蓉*

(四川大学生命科学院,四川 成都 610064)

摘 要: 目的 研究百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* 及其同属植物沿阶草 *O. bodinieri* 四川所产 10个居群间的遗传多样性。方法 以 40个 10碱基随机引物进行 RAPD分析。结果 11个有效引物扩增获得 515条 DNA带,通过聚类分析,构建 DNA分子系统树图,确定了麦冬及沿阶草的居群及种间亲缘关系。结论 (1)供试样品间遗传差异明显。具有丰富的遗传多样性,但是其遗传差异与地理分布联系并不紧密,而与形态差异联系较紧; (2)麦冬与沿阶草之间存在着较大的遗传差异,亲缘关系较远。

关键词: 麦冬;沿阶草;遗传多样性; RAPD;聚类分析。

* 收稿日期: 2001-06-11

基金项目: 四川省重点项目

作者简介: 徐 柯 (1979-),男,重庆市垫江县人,硕士 (在读), 1996~ 2000年就读于四川大学生物系生物学基地班,毕业后在四川大学生命科学院攻读硕士至今,攻读专业方向为微生物遗传,主要从事中药分子遗传学研究。 Tel: 028-85412842 E-mail: xk311@ 263. net; xk311@ sina. com

* 通讯作者

中图分类号: R282.710.03 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0648-05

RAPD on natural populations in *Ophiopogon japonicus* in Sichuan Province

XU Ke, ZHENG Ming, CAO Yi, JIANG Yan, QIAO Dai-rong
(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract **Object** To assess the genetic diversity among ten natural populations in *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. and *O. bodinieri* Levl. (Liliaceae) in Sichuan Province. **Methods** Forty random decamer primers were screened for Random Amplified Polymophic DNA (RAPD) fragments. **Results** Based on cluster analysis of 515 DNA bands amplified by 11 primers, a DNA molecular dendrogram was established, and the relationship of the populations and seeds between *O. japonicus* and *O. bodinieri* was set up. **Conclusion** 1. Distinct genetic differences and extensive genetic diversity are presented among the samples. The genetic differences are related to morphological differences, but not to geographic regions; 2. Quite genetic differences are presented between *O. japonicus* and *O. bodinieri*, it suggests that they have farther relationships.

Key words *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.; *Ophiopogon bodinieri* Lévl.; genetic diversity; RAPD; cluster analysis

麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 为百合科沿阶草属多年生草本,我国许多地区均有分布。主产于四川、浙江、湖北等地,具有养阴生津,润肺清心的功能,是清热止咳的主要药物。沿阶草 *O. bodinieri* Lévl. 的块根亦是中药麦冬的来源之一。由于其品种繁多,产地不同,有效成分不一,且无有效成分标识,难以用传统方法进行道地性鉴定与分类。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 是 90年代发展起来的分子标记技术[2,3],它通过分析遗传物质 DNA经 PCR扩增后的多态性来诊断生物内基因排布与外在形状表现规律,具有灵敏性高,不受环境、发育数量形状遗传的影响的优点,能客观地揭示供试材料间 DNA差异,且技术操作简便、快速、省时、省力[4-8]。本研究利用 RAPD技术,主要以四川产麦冬为研究对象,从分子水平分析其居群间差异,物种遗传变异性和亲缘关系,为进一步研究其有效成分含量与 DNA遗传标识对应关系,建立一套完整实用的道地川产麦冬的分子鉴定方法打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料: 研究包括四川境内各地所产麦冬及沿阶草共 10个自然居群 (表 1)。

1.2 方法

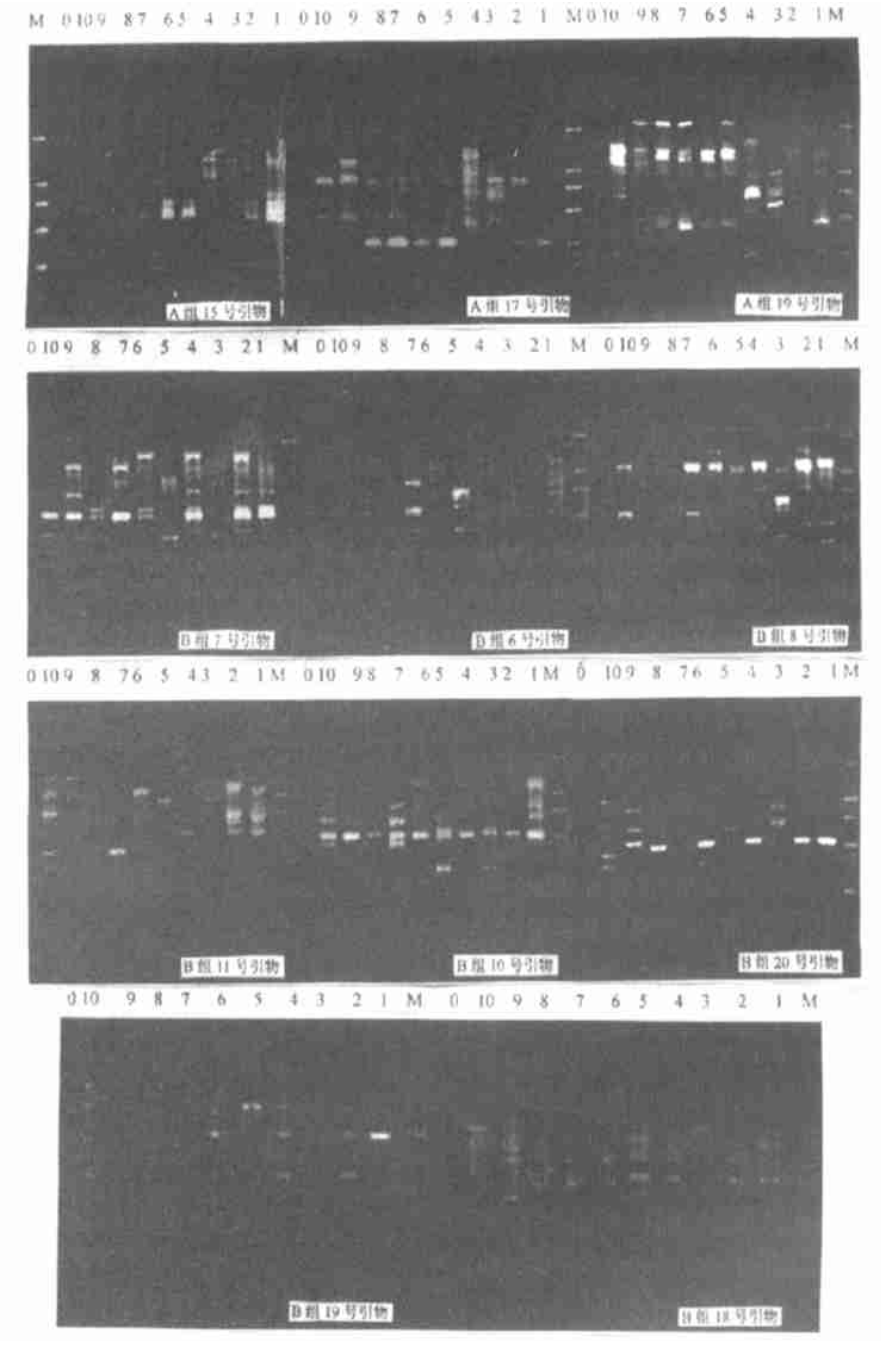
1.2.1 基因组 DNA的提取和检测: 采用 QIAGEN公司 Dneasy Plant Mini Kit提取,0.7% 的琼脂糖凝胶电脉,经 EB (溴化乙锭) 染色后,在紫外检测仪上观察其纯度并判别 DNA分子的大小及一致性。

表 1 供试材料

序号	种类	来源
1	沿阶草 *Ophiopogon bodinieri*	成都龙泉驿
2	麦冬 *O. japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. (小叶型)	成都四川大学望江校区
3	麦冬 (大叶型)	成都四川大学望江校区
4	麦冬	四川大学华西校区
5	麦冬	成都中医药大学
6	麦冬	绵阳
7	麦冬	自贡
8	麦冬	峨嵋
9	连药沿阶草 *O. bockianus* Diels	峨嵋
10	沿阶草	峨嵋

1.2.2 基因组 DNA的扩增: 所用 DNA扩增仪为 Fero Tec公司 TC-25/H型扩增仪。所用随机引物为 Operon公司生产的 A, B两组共 40个引物 (表 2)。PCR反应总体积为 25μL。其组成如下: 10× Buffer 2.5μL (含 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 15 mmol/L $MgCl_2$, 0.1% 明胶) dNTP 2.5μL (1.25 mmol/L),基因组 DNA 1μL (约 25 mg/L), Taq聚合酶 2μL (1 U/μL),随机引物 2μL, ddH_2O 15μL。扩增程序: 预变性 94℃ 3 min;然后每个循环: 94℃ 15 s, 36℃ 30 s, 72℃ 1 min, 45个循环后,于 72℃ 继续延伸 7 min。

1.2.3 引物筛选及 DNA多态性分析: 用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离基因组 DNA的扩增产物,4 V/cm稳压电泳, 0.5 mg/L EB染色后在紫外检测仪上观察扩增的多态性并记录,然后照相 (图 1)。



"M"为 PCR分子标记 DL2000;"0"为不加 DNA模板的阴性对照;样品编号与表 1相同。

图 1 11种有效引物的 PCR扩增图谱

1.2.4 数据的统计分析: 按琼脂糖凝胶同一位置上 DNA带的有无进行统计,有带 (包括弱带) 记为"1",无带记为"0"。利用 Watson等 (1966) 系数计算出各物种之间的遗传距离 $D=(b+c)/(2a+b+c)$ (a为两样品共有的带, b, c为两样品各自的特异带) (表 3),再用最短距离法对其进行聚类分析,并构建 DNA分子系统树图 (图 2)[1,9,10]。

2 结果及分析

2.1 引物的筛选: 从 40个 10 bp随机引物中筛选出了 11个有差异带的有效引物 (即在全部 10个样品的基因组 DNA中均扩增出 DNA片段的引物) A15, 17, 19; B6, 7, 8, 10, 11, 18, 19, 20。这 11个有效引物共扩增出 515条 DNA (图 1),其中 475条表现出多态性,占总带数的 92.23%,平均每个引物扩增出的多态带为 43.18条。这表明麦冬及沿阶草种间具有很高的多态性,遗传变异很大。

2.2 聚类分析: 首先根据 Watson等 (1966年) 距离系数 $D=(b+c)/(2a+b+c)$ 计算得到 10个种

间的遗传距离矩阵 (表 3)。遗传距离越大,种间亲缘关系也就越远。

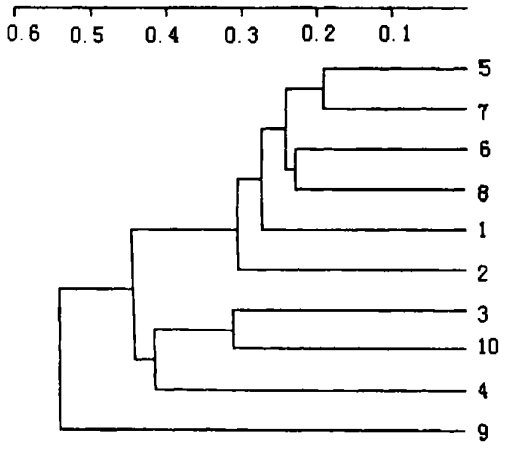


图 2 10个自然居群的麦冬和沿阶草分子系统树图 RAPD

在表 3的基础上,以最短距离法进行聚类,得出10个种的 DNA分子系统树图 (图 2)。

表 2 引物序列

序号	序列	序号	序列
A01	CAGGCCCTTC	B01	GTTTCGCTCC
A02	TGCCGAGCTG	B02	TGATCCCTGG
A03	AGTCAGCCAC	B03	CATCCCCCTG
A04	AATCGGGCTG	B04	GGACTGGAGT
A05	AGGGGTCTTG	B05	TGCGCCCTTC
A06	GGTCCCTGAC	B06	TGCTCTGCCC
A07	GAAACGGGTG	B07	GGTGACGCAG
A08	GTGACGTAGG	B08	GTCCACACGG
A09	GGGTAACGCC	B09	TGGGGGACTC
A10	GTGATCGCAG	B10	CTGCTGGGAC
A11	CAATCGCCGT	B11	GTAGACCCGT
A12	TCGGCGATAG	B12	CCTTGACGCA
A13	CAGCACCCAC	B13	TTCCCCCGCT
A14	TCTGTGCTGG	B14	TCCGCTCTGG
A15	TTCCGAACCC	B15	GGAGGGTGTT
A16	AGCCAGCGAA	B16	TTTGCCCGGA
A17	GACCGCTTGT	B17	AGGGAACGAG
A18	AGGTGACCGT	B18	CCACAGCAGT
A19	CAAACGTCGG	B19	ACCCCCGAAG
A20	GTTGCGATCC	B20	GGACCCTTAC

表 3 遗传距离矩阵

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000 0									
2	0.395 3	0.000 0								
3	0.555 6	0.570 1	0.000 0							
4	0.368 4	0.447 5	0.420 0	0.000 0						
5	0.451 3	0.504 6	0.472 7	0.592 9	0.000 0					
6	0.340 4	0.305 3	0.567 0	0.377 4	0.454 5	0.000 0				
7	0.337 4	0.333 3	0.607 8	0.504 8	0.190 6	0.428 6	0.000 0			
8	0.272 7	0.318 7	0.688 9	0.536 8	0.557 9	0.225 2	0.241 4	0.000 0		
9	0.526 3	0.570 1	0.603 6	0.543 8	0.681 4	0.580 0	0.600 0	0.600 0	0.000 0	
10	0.504 6	0.600 0	0.312 5	0.651 4	0.666 7	0.578 9	0.603 6	0.644 4	0.578 0	0.000 0

从图 2可以看出: 5, 7, 6, 8, 2这几个麦冬居群的样品包括 1 (成都所采沿阶草) 遗传距离较近,组成一大组;而 3, 10, 4这几个样品关系较近,构成另一组;而 9 (连药沿阶草) 与其它种关系均较远。除样 1 (成都所采沿阶草) 与样 10 (峨嵋所采沿阶草) 外,从分组情况看不出其与样品地理分布位置有密切关系,例如: 5 (采自中医药大学的麦冬) 与 6 (采自绵阳的麦冬) 间遗传距离很小,而 5与 3同为成都所采样品,相互间遗传距离却很大。但是结合形态学特征,可以看出聚类结果是与它们之间形态差异相关的。第一组的几个样品均为叶片较小,植株较矮;而第二组的几个样品从形态上看基本上都为叶片长大,植株较高。另外 9 (连药沿阶草) 与其他样品间差异较大,也是与它们的形态分类研究结果相一致的。连药沿阶草其植株具有明显的茎,而其它几种植株的茎均极短而不明显,所以尽管样 9与样 8,样 10均为峨嵋所采,其遗传差异仍很明显。从另一方面来看,尽管麦冬与沿阶草之间的形态差异很小如 1与 2,但遗传差异却较大,用 RAPD可较好地区分。

3 讨论

RAPD分析存在一定限制,最大的限制因素就是稳定性较差。在本研究中,我们通过梯度实验确定了 RAPD反应的最佳条件,在此条件下的 RAPD均较稳定,重复性还是相当好的。特别是 RAPD分析具有比其它 DNA技术简单易行,经济快速等优点,在传统的形态学等分类基础上,将会为麦冬的系统分类进化研究提供丰富资料。

另一方面,在进行种间和属间的亲缘关系研究时,也应看到:因不同种或属间的扩增产物难以作同源性分析,只能将带谱转化为数据,然后从相似性或遗传距离上去分析亲缘关系,其结果可能与实际的系统有差异,这是我们值得注意的一点。

参考文献:

[1] Cook L M. Population Genetics [M]. London: Chapman and Hall, 1976.

[2] Gottlieb L D. Electrophoretic evidence and plant population [J]. Prog Phylochem, 1981, 1: 1-46.

[3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K L *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
[4] Sobral B W S, Honeycutt R J. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 105-112.
[5] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, *et al*. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliridia sepion*. and *G. maculata* using RAPD markers [J]. Heredity, 1992, 69: 465-472.
[6] Dawson I K, Chalmer K J, Waugh R, *et al*., Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers[J]. Mol Ecol, 1993, 2: 151-159.
[7] Virk P S, Ford-lloyd B V. Use of RAPD for the study of diversity within plantgermplasm collection[J]. Heredity, 1995, 74: 170-179.
[8] Wei J Z, Campbell W F, Wang R R C. Genetic variability in Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD [J]. Genet Resources Crop Evol, 1997, 44: 117-125.
[9] Chen H, Zhu L H, Xu J C, *et al*. Construction of rice RAPD molecular linkage map[J]. Acta Bot Sin, 1995, 37: 667-684.
[10] Zhou Y H, Yang J L, Zheng Y L, *et al*. RAPD study on inter-species relationships in *Roegneria* [J]. Acta Bot Sin, 1999, 41: 1076-1081.

植物药材总 DNA提取

李晓波[1,2],冯 波[2],张朝晖[3],王峥涛[2],徐珞珊[2*]
(1. 上海交通大学药学院,上海 200030; 2. 中国药科大学中药学院,江苏 南京 210038; 3. 第二军医大学南京军医学院,江苏 南京 210099)

摘 要: 目的 为获得高质量的 DNA,研究木质部较发达的根、根茎类以及茎木类药材的 DNA提取方法。方法 总 DNA的提取过程包括用 Tris缓冲液洗净、CTAB抽提和纯化。结果 对升麻、木、木香、乌药、芍药和木通等进行了 DNA提取,能较好的去除色素、多糖等干扰 PCR物质。结论 本法使用常用试剂,成本低,易于推广,为药材 DNA分子鉴别的应用奠定了基础。

关键词: DNA提取;中药材;升麻
中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0652-03

Isolation of total DNA from Plant Chinese medicinal materials

LI Xiao-bo[1,2], FENG Bo[2], ZHANG Zhao-hui[3], WANG Zheng-tao[2], XU Luo-shan[2]
(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2. College of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 3. Nanjing Military Medical College, Second Military Medical University, Nanjing 210099, China)

Abstract **Object** To explore the method for high-quality DNA extract from plant Chinese medicinal materials containing developed xylem. **Methods** The process of DNA includes wash with Tris-buffer, extract with CYAB-buffer and purification mainly. **Results** Using this method, the total DNA was isolated from *Cimicifugae foelida* L., *Arlia chinensis* L., *Paeoniae lactiflora* Pall., *Aucklandia lappa* Decne., *Lindera aggregata* (Slms) Kostern., and *Akebia quinata* Decne. etc. This method is preferable in removing pigments, polysaccharides, substance disturbing PCR. **Conclusion** In this process, common reagents are used, lower cost is of advantage to popularize. This study provids the applying foundations for the DNA identification of plant Chinese medicinal materials.

Key words DNA extract; plant Chinese medicinal materials; *Cimicifugae foelida* L.

DNA分子鉴别的第一步就是要获得高质量的可作为 PCR模板的 DNA 药材不同于新鲜的动植物材料,药材的干燥、加工、贮藏等过程均造成了 DNA不同程度的降解;同时药材中的蛋白质、多糖以及多酚类化合物等都是影响 PCR成败的因素。因此,针对不同药材采用不同的 DNA提取方法才

* 收稿日期: 2001-11-06
基金项目: 中国博士后科学基金(1998年)
作者简介: 李晓波 (1963-),女,回族,博士,1991~1998年赴日留学攻读学位,主要从事生药学,分子生物学研究。Tel: (021) 62933467 E-mail: xbli@mail.sjtu.edu.cn