

表 4 不同播期和用种量鱼腥草植株地上部分甲基正壬酮含量和总量  
Table 4 Content and total amount per area of methynonyketone in overground part of *H. cordata* plant in different sowing date and sowing quantity

播期 用种量	甲基正壬酮		播期 用种量	甲基正壬酮	
	含量 /( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	总量 ( $\text{g} \cdot \text{小区}^{-1}$ )		含量 /( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	总量 ( $\text{g} \cdot \text{小区}^{-1}$ )
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	55.60	1.56	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	22.51	0.67
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	34.23	1.06	A <sub>2</sub> B <sub>4</sub>	21.45	0.70
A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	64.31	1.73	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	27.81	0.58
A <sub>1</sub> B <sub>4</sub>	64.49	1.79	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	31.22	0.85
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	16.45	0.50	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	34.99	0.87
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	21.21	0.57	A <sub>3</sub> B <sub>4</sub>	21.97	0.61

播种 本试验范围内,播期对新品系全株鲜重影响不显著,说明其适合播种的范围的确较宽,但播期对地上和地下部分各自鲜重有明显影响,以 10月 15日播种者地上部分鲜重最重,11月 4日播种者地下部分鲜重最重。鉴于 9月 25日播种者地上部分甲基正壬酮含量以及单位面积甲基正壬酮总量均普遍较高,建议生产中若以采收地上部分鲜草为主,最好于 9月下旬播种。若以培育种根或收获地下部分为主要目的,可适当推迟播期至 11月上旬。至于 11月 4日播种者地下部分鲜重最重的原因估计与此时种根比较充实,根茎上的腋芽较为饱满有关。

有关鱼腥草栽培的文献均未见对鱼腥草用种量的描述<sup>[1,2]</sup>。本试验发现,用种量主要对鱼腥草新品系地上部分鲜重有显著影响,但多重比较结果未发现不同用种量间有显著差异。多重比较结果还表明,

不同播期用种量间,地上部分鲜重 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub>B<sub>4</sub> 与 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>, A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 和 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 间差异不显著,仅与 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> 间差异显著。全株鲜重 A<sub>2</sub>B<sub>4</sub> 和 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub> 与 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>, A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> 和 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> 间差异不显著,仅与 A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> 间差异显著。故综合产量质量等因素,认为若 9月 25日播种,以 3 kg/小区,即 3 000 kg/hm<sup>2</sup> 左右用种量比较适宜。若播期推迟,则用种量以 4.5 kg/小区,即 4 500 kg/hm<sup>2</sup> 左右用种量比较合算。

References

[1] Xie R G. Development and application value of wild vegetable *Houttuynia cordata* and its cultural techniques [J]. *Hubei Agricultural Sci* (湖北农业科学), 1995, (1): 48-50.  
[2] Qi Y C, Hu C, Hou J R. Cultivation techniques of *Houttuynia cordata* [J]. *Special Wild Economic Animal Plant Res* (特产研究), 1997, (4): 60-61.

## 新疆产麻黄的 RAPD 分析

党荣理<sup>1</sup>,马永红<sup>1</sup>,吴霞<sup>2</sup>,刘庆华<sup>2</sup>

(1. 新疆军区卫生防疫大队,新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 目的 建立新疆产 3种麻黄指纹图谱,进行遗传多样性分析。方法 通过 20个 10碱基随机引物对新疆 3种麻黄进行 PCR扩增,用无药用价值的膜果麻黄作对照,通过计算遗传相似性系数,建立 UPGMA 聚类图。结果 共扩增出 189个多态位点,建立了他们的基因组 DNA 指纹图谱。结论 物种间遗传差异明显,具有丰富的遗传多样性;膜果麻黄与其他 3种药用麻黄的差异较大;药用麻黄中,木贼麻黄相对独立,中麻黄与兰麻黄遗传距离较近,且具有较为相同的遗传关系。

关键词: RAPD;麻黄;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)09-0861-03

RAPD analysis of three species of *Ephedra* Tourn. ex L. growing in XinjiangDANG Rong-hi<sup>1</sup>, MA Yong-hong<sup>1</sup>, WU Xia<sup>2</sup>, LIU Qing-hua<sup>2</sup>

(1. Brigade of Epidemic Prevention of Xinjiang Military Area, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000, China)

**Key words** RAPD; *Ephedra* Tourn. ex. L.; genetic diversity

麻黄是一种传统中药材,具有发汗、平喘、利尿祛风的作用。新疆麻黄种类约有 9 种 1 变种<sup>[1]</sup>,但药用仅 3 种,即木贼麻黄、中麻黄和兰麻黄。由于种类不同,其有效成分及药用价值也不尽相同,为了进一步分析中药麻黄的种间差异,我们利用 RAPD 技术对新疆 3 种中药麻黄并用无药用价值的膜果麻黄作对照进行基因组 DNA 随机多态性分析,建立不同种的 DNA 指纹图谱,为中药材的鉴定和标准化提供依据。

RAPD 技术自 20 世纪 90 年代产生以来,广泛应用于遗传图谱的构建、基因克隆、分子系统学及植物群体遗传结构等研究领域。由于 RAPD 分析是完全随机扩增,不需要对所研究的物种的分子遗传学背景有所了解,因为可选择的随机引物数十分巨大,所检测的位点在基因组中随机分布,因而可以更客观地说明群体遗传多样性的水平<sup>[2]</sup>。

**1 材料和方法**

1.1 材料来源:研究材料均采自于新疆本地,为新鲜幼枝叶,具体见表 1

**1.2 方法**

表 1 材料来源

Table 1 Source of materials

序号	植物种名	采集地	样品 植株数	采集时间
1	木贼麻黄 <i>Ephedra equisetina</i> Bge.	奇台	18	2001-07
2	中麻黄 <i>E. intermedia</i> Schrenk. et C. <i>A. Mey</i>	和静	20	2001-08
3	兰麻黄 <i>E. glauca</i> Regel	库车	16	2001-08
4	膜果麻黄 <i>E. przewalskii</i> Stapf	库车	20	2001-08

1.2.1 基因组 DNA 提取:取同一物种的 18~20 株的幼嫩枝叶,混合后称取 3 g,经液氮处理提取基因组 DNA,基因组 DNA 的提取方法采用高盐低 pH 值法<sup>[3]</sup>。

1.2.2 引物选择:选取 40 个 10 碱基长度的寡核苷酸随机引物(购自上海生物工程公司),分别扩增 4 个 DNA 样品,从中筛选出扩增性强、重复性好、多态性高的 20 个引物,引物序列见表 2,全部用于麻黄样品基因组 DNA 的扩增。

表 2 产生多态位点的随机引物

Table 2 Primers which produced polymorphic bands

引物	序列	总带数	多态带	引物	序列	总带数	多态带
S1	GTTTCGCTCC	12	10	S16	TTTGCCCGGA	9	9
S3	CATCCCCCTG	12	11	S17	AGGGAACGAG	15	13
S4	GGACTGGAGT	16	15	S20	GGACCCTTAC	10	10
S5	TGCGCCCTTC	11	5	S26	GGTCCCTCAC	8	8
S6	TGCTCTGCCC	9	9	S27	GAAACGGGTG	9	8
S8	GTCCACACGG	13	11	S32	GTGATCGCAG	10	7
S10	CTGCTCCAC	14	11	S34	TCTGTGTTGG	11	9
S11	GTAGACCCGT	7	5	S37	GACCGCTTCT	15	15
S12	CCTTGACGCA	10	7	S40	GTTGCGATCC	8	5
S13	TCCCCCGCT	15	13				
S15	CCACCCTCTT	13	8	合计		227	189

1.2.3 PCR 反应:PCR 扩增反应在 PE 公司 5700 型定量 PCR 仪上进行,反应总体积为 25  $\mu$ L。其成分为:10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 25 ng  $\mu$ L 模板 DNA 1  $\mu$ L, 10 pmol 引物 1  $\mu$ L, 5 U  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.3  $\mu$ L。扩增程序为:首先,95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后进行以下 40 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7

min。取 10  $\mu$ L 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色后,在 Alpha Imager 2200 型凝胶成像系统上观察并拍照。

1.2.4 数据处理:电泳图谱中的每一条带均代表了与模板 DNA 互补的一对结合位点,可记为一个优点,根据相对分子质量标准对照反应产物在胶上的对应位置,估计扩增产物的相对分子质量大小,有带的记为 1,无带的记为 0,开成 0/1 矩阵,进行带数统计。

计算遗传系数  $F [F = 2N_{ab} / (N_a + N_b)]$  和遗传距离  $D (D = 1 - F)$ , 利用 UPGMA 法进行聚类分析

## 2 结果和分析

2.1 RAPD产物的多态性: 在所采用的 40条引物中, 其中 20条引物在对 4种麻黄的 DNA样品进行 RAPD分析中得到良好的结果, 图 1列举了 S1 S13 两条引物扩增产物的电泳图谱。通过分析发现 20条引物共检测到 227个位点, 位点范围在 200~ 2 500 bp之间, 膜果麻黄位点最多, 共计 160个, 兰麻黄最少, 仅 101个。在所有位点中多态位点 189个, 占总位点的 79.75%, 平均每每条引物扩增出 9.45条多态位点。这说明麻黄具有丰富的遗传多样性。将产物多态性结果的随机引物的所有扩增位点均用于分析, 并将它们看作性状, 即 4个供试麻黄的 227个性状, 其中 189个性状是多态的。

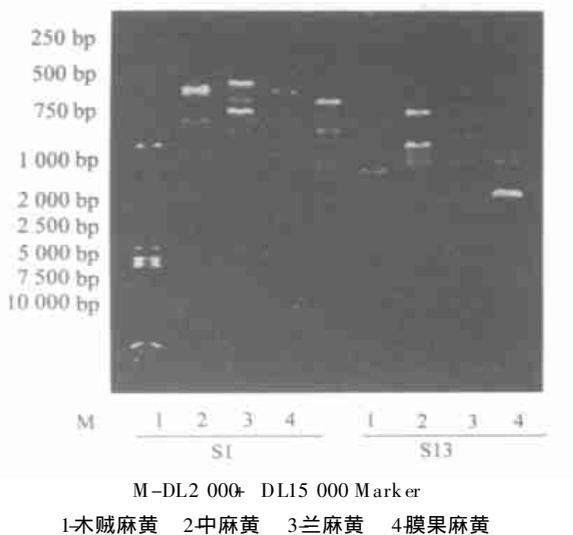


图 1 引物 S1 与 S13 对 4种麻黄样品的扩增图谱

Fig. 1 RAPD amplified for four species of *Ephedra* respectively with primers S1 and S13

2.2 种间遗传关系分析: 据  $F = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$  ( $N_{ab}$  为二者共同的带数,  $N_a$   $N_b$  分别为二者特有的带数) 计算相似系数, 遗传距离  $D$  为  $1 - F$ , 列出遗传距离矩阵 (表 3)。

表 3 4种麻黄的遗传距离矩阵

Table 3 Matrix of genetic distances in four species of *Ephedra* Tourn. ex L.

	木贼麻黄	中麻黄	兰麻黄	膜果麻黄
木贼麻黄	0	0.546 2	0.490 0	0.718 7
中麻黄		0	0.359 6	0.557 9
兰麻黄			0	0.490 0
膜果麻黄				0

通过聚类分析可以看出, 这 4种麻黄可以分为 3个组 (图 2), 膜果麻黄为 1组, 木贼麻黄为 1组, 中麻黄与兰麻黄为 1组。

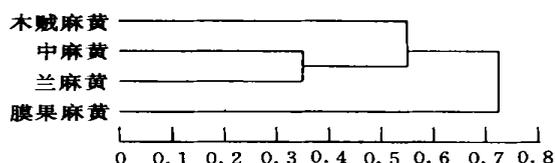


图 2 4种麻黄聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA in four species of *Ephedra* Tourn. ex L.

## 3 讨论

根据 RAPD结果, 不同种植物指纹图谱有一定的差异, 特别是无药用价值的膜果麻黄与其他 3种差异较大, 而中麻黄与兰麻黄差异较小。传统的植物分类认为, 木贼麻黄为单子麻黄亚派, 中麻黄、兰麻黄为欧亚麻黄亚派, 膜果麻黄为翅麻黄亚派<sup>[4]</sup>, 这和 RAPD结果及聚类分析结果相一致, 说明植物的基因图谱与亲缘关系的一致性。

从有效成分看, 北疆山地生长的木贼麻黄体内所含的麻黄素, 左旋麻黄素占 80%, 右旋麻黄素占 20%; 在南疆山区生长的兰麻黄与中麻黄的体内所含麻黄素, 右旋麻黄素占 80%, 左旋麻黄素占 20%<sup>[5]</sup>。基因组 DNA指纹图谱中, 兰麻黄与中麻黄比较接近, 木贼麻黄基因图谱与前两者差异较大, 而膜果麻黄不含有效成分, 基因图谱与前三者相差最大, 这说明药效成分与基因图谱二者之间存在一定的相关性。

致谢: 新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点开放实验室提供实验条件。

## References

- [1] Liu G J, Cheng C H. *Xinjiang Ephedra* (新疆麻黄) [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Medicine Publishing House, 1992.
- [2] Guo B L, Dai B. The technical question II of DNA molecular marker study on Chinese traditional medicine: dissertation of RAPD experimental technology and methodology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 178-180.
- [3] Wang P X, Huang F, Zhou L, et al. Methodological compare of genomic DNA purification on botanic Chinese traditional medicine [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 1999, 10(1): 18.
- [4] И. Ф. МикоЕВ, The system birth and geographical distribution of the genus *Ephedra* Tourn. ex L. [J]. *Xinjiang Forestry Sci Technol* (新疆林业科技), 1985, 2: 51-60.
- [5] Li Z W, Lu Z Y. *Industrialization of Xinjiang Characteristic Agricultural Resources* (新疆特色农业资源产业化) [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House, 2000.