

· 药材与资源 ·

红景天属 4 种植物 RAPD 分析与分类鉴定

胡挺松¹, 陆一鸣^{1,2}, 马兰青¹, 李彦舫^{1*}

(1. 中国人民解放军军需大学 植物基因工程研究中心, 吉林 长春 130062;

2. 第二军医大学 基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 用 RAPD 技术对红景天属(*Rhodiola* L.) 的大花红景天 *R. crenulata*、长鞭红景天 *R. fastigiata*、狭叶红景天 *R. kirilowii* 和高山红景天 *R. sachalinensis* 4 种药用植物进行分子水平鉴定。方法 用 CTAB 法提取红景天属原植物总 DNA, 以 200 条随机引物进行随机扩增。结果 用 OPA 4 (AATCGGGCTG)、OPB 7 (GGTGACGCA G)、OPB 18 (CCACA GCA GT)、OPX 14 (ACA GGTGCTG) 和 OPZ 13 (GACTAA GCCC) 作随机扩增引物进行随机扩增时, 可得到识别这些物种基因组 DNA 的多态片段。结论 RAPD 法能有效地鉴别红景天类药材, 把大花红景天、长鞭红景天、狭叶红景天和高山红景天区分开。

关键词: 红景天属; RAPD; 分类鉴定

中图分类号: R 282. 710. 3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)11-1286-04

Identification of four *Rhodiola* L. plants by RAPDHU Ting-song¹, LU Yim-ing^{1,2}, MA Lan-qing¹, LI Yan-fang¹

(1. Research Center of Plant Genetic Engineering of Quartermaster University of People's Liberation Army,

Changchun 130062, China; 2. Department of Medical Genetics, Department of Basic Medicine,

Second Military Medical University, Shanghai 200433 China)

Abstract: **Object** To identify the crude drugs of *Rhodiola* L., including *R. crenulata*, *R. fastigiata*, *R. kirilowii*, and *R. sachalinensis* by RAPD. **Methods** General DNA was isolated from fresh leaves of the four species in *Rhodiola* L. by CTAB and the random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to identify them. **Results** The polymorphic fragment of DNA fingerprints of different species was compared by primers OPA 4 (AATCGGGCTG), OPB 7 (GGTGACGCA G), OPB 18, OPX 14 (ACA GGTGCTG), and OPZ 13 (GACTAA GCCC). The studies showed that they have different relationships in heredity and the method of RAPD can be used to identify them easily. **Conclusion** The raw medicinal materials *Rhodiola* L. can be identified by RAPD, and the above-mentioned four species are distinguished.

Key words: *Rhodiola* L.; RAPD; classified identification

红景天属(*Rhodiola* L.) 植物为多年生草本或亚灌木, 世界有 90 余种, 我国有 70 多个种, 常具肉质根及根状茎, 是近年来新开发的中草药, 主要以其根和根茎入药, 主要药用成分有红景天苷、酪醇等。具有抗缺氧、抗微波辐射、抗衰老、调节内分泌系统等作用^[1,2]。红景天植物来源复杂, 商品药材种类多。但红景天各个种功用不一, 不同种之间替代使用, 用药混乱^[1,2]。因此, 有必要进行全面评价, 确定种类的优劣和功效取舍。对红景天药材的分类和正确鉴定就尤为重要。本研究利用 RAPD 技术^[3]对市场常见

的大花红景天 *R. crenulata* (Hook. f et Thoms.) S. H. Fu、长鞭红景天 *R. fastigiata* (Hook. f et Thoms.) S. H. Fu、狭叶红景天 *R. kirilowii* (Reg.) Maxim、高山红景天 *R. sachalinensis* A. Bor 进行了分子水平鉴定, 为红景天类药材的分子鉴定提供依据, 同时初步探讨了这 4 种植物之间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料: 大花红景天、长鞭红景天、狭叶红景天、高山红景天(表 1), 每个种各取 5 株植物的幼嫩叶片, 混合提取总 DNA。

* 收稿日期: 2004-02-02

作者简介: 胡挺松(1977—), 男, 四川省眉山人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学方面的研究

* 通讯作者 Tel(0431)6986038

表 1 实验材料的来源

Table 1 Source of experimental materials of *Rhodiola* L.

编号	名 称	产 地
1	大红花景天 <i>R. crenulata</i>	四川甘孜州
2	长鞭红景天 <i>R. fastigiata</i>	四川甘孜州
3	狭叶红景天 <i>R. kirilowii</i>	四川甘孜州
4	高山红景天 <i>R. sachalinensis</i>	吉林长白山

1.2 仪器与试剂: PCR 仪(德国 Biometra); 恒压恒流电泳仪(北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(上海 Tannon 公司); 电热三用水箱(北京市医疗设备厂); 离心机(上海安亭科学仪器厂); CTAB (Bebco 公司)、Tris (Bebco 公司)、EDTA (Bebco 公司)、Taq 酶(北京鼎国生物技术公司)、dNTP (Bebco 公司)、RAPD 随机引物(Operon 公司)、Marker (Takara 公司)。

1.3 随机引物: Operon 公司生产的 A、B、H、G、J、K、S、X、Y、Z 等组的 200 条引物经筛选, 得到扩增条带清晰、多态性较好的 38 条随机引物(OPA 4、OPA 10、OPB 7、OPB 15、OPB 18、OPH 3、OPH 4、OPH 12、OPH 15、OPH 18、OPG 3、OPG 4、OPG 12、OPG 13、OPG 16、OPG 17、OPJ 1、OPJ 10、OPJ 14、OPJ 18、OPJ 19、OPJ 20、OPK 7、OPK 10、OPK 11、OPS 3、OPS 11、OPS 19、OPX 3、OPX 9、OPX 14、OPX 15、OPY 1、OPY 15、OPZ 11、OPZ 13、OPZ 18、OPZ 20), 表 2 列出了其中的 14 条引物序列。

表 2 引物序列及其扩增带数

Table 2 Primers used for RAPD and amplified band

引物名称	引物序列 5' - 3'	扩增带数
OPA 04	AA TCGGGCTG	5~ 7
OPB 07	GGTGACGCA G	5~ 9
OPB 18	TGA GTGGGTG	5~ 9
OPH 18	GAARCGGCCA	5~ 7
OPJ 10	AA GCCCGA GG	7~ 8
OPJ 19	GGACACCACT	3~ 6
OPJ 20	AA GCGGCCTC	7~ 8
OPK 10	GTGCAACGTG	5~ 6
OPS 03	CAGA GGTCCC	4~ 7
OPS 11	AGTCGGGTGG	2~ 5
OPX 14	ACAGGTGCTG	5~ 8
OPY 15	AGTCGCCCTT	7~ 8
OPZ 13	GACTAAGCCC	6~ 12
OPZ 20	ACTTTGGCGG	4~ 8

1.4 DNA 的提取: 采用 CTAB 法并稍加改进^[4]。取 0.1~ 0.25 g 新鲜幼嫩叶片, 于液氮中迅速研磨成粉。将冻粉迅速转入 7 mL 离心管中, 加入 3 mL 65 预 热 提 取 缓 冲 液 (2 g/100 mL CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA pH 8.0,

100 mmol/L Tris Cl pH 8.0), 混匀, 于 65 保 温 30 min, 其间轻柔搅动 2~ 3 次。加入等体积的氯仿-异戊醇 (24 1) 抽提两次, 轻缓颠倒混匀, 静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸上清液于另一离心管中, 加入 2/3 倍体积的异丙醇沉淀 DNA, 轻缓颠倒混匀, 室温下放置 15 min。10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 室温下微干, 溶于 500~ 700 μ L TE 缓冲液。加入 50 μ g/mL RnaseA, 37 保温 1 h。用等体积的氯仿-异戊醇 (24 1), 抽提 1 次。上清液中加入终浓度为 0.2~ 0.4 mol/L NaCl, 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, - 20 放置约 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。用 70% 乙醇洗涤沉淀 2~ 3 次, 自然干燥后溶于 50~ 100 μ L TE, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查后, - 20 保存备用。

1.5 RAPD 分析: 扩增反应在 25 μ L 的体系中进行, 其中含有 10 $\times$ PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L、dNTP (10 mmol/each) 0.5 μ L、随机引物 (8 pmol/次) 1.0 μ L、Taq 酶 (2 U/ μ L) 0.5 μ L、模板 DNA (稀释 10 倍) 2.0~ 18.5 μ L 双蒸水。

PCR 反应程序^[3]: 经 94 加热 4 min, 使模板 DNA 变性, 然后进入下列温度循环: 94 变性 45 s, 37

退火 45 s, 72 延伸 1 min, 共进行 40 个循环。循环结束后, 在 72 延伸 10 min。扩增产物 10 μ L 加 10 $\times$ Loading 缓冲液, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, 紫外灯下观测电泳结果并拍照。扩增反应重复 2 次。

1.6 多态性数据的分析: 扩增产物按条带有无分别赋值, 强反应带记“1”, 弱反应带重复出现记“1”, 弱反应带出现但不重复记“0”, 没有带记“0”, 得 RAPD 反应的原始数据。计算供试材料间 Jaccard 遗传相似系数 (GS)^[5], $GS = a/(a + b + c)$, 其中 a 为 2 种共有的带数, b 为 B 种有而 C 中没有的带数, c 为 C 种有而 B 中没有的带数。利用 SPSS11.0 统计分析软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 基于 RAPD 用红景天 DNA 的提取: RAPD 具有操作方便, 灵敏快捷的优点, 但存在扩增重复性较差的问题。而 DNA 的提取质量直接影响 RAPD 的重复性、稳定性, 综合红景天 DNA 提取结果, 样品量以每 7 mL 离心管 3 mL 提取液中加 0.1~ 0.25 g 鲜样品较为适宜; 在加提取液前用液氮研磨, 研磨时尽量细且均匀, 并使冻粉呈干粉状; 因红景天含较多的酚类物质, 可以加少量的抗氧化剂 β -巯基乙醇, 经多次氯仿-异戊醇 (24 1) 抽提, 异丙醇和乙醇两次

沉淀后可得到色泽较好纯度较高的DNA(图 1-A), 符合 RAPD 的扩增要求。

2.2 红景天 RAPD 扩增体系的优化: 由于红景天 DNA 的 RAPD 扩增未见报道, 对于一个新类群的 RAPD 分析, 确定最适模板 DNA 的扩增浓度是关键, 不同的类群有不同的最佳范围^[6]。除 DNA 的纯度与浓度, 引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、Taq 来源和用量、扩增程序与循环周期以及所用的 PCR 扩增仪型号均能影响 RAPD 反应的扩增结果^[7], 这些条件稍有变化, 容易产生假扩增带, 结果完全不一样, 影响实验的稳定性, 重复性。对以上各影响因素通过梯度分析, 进行优化, 发现 Taq 酶(2 U/ μ L)用量从 0.5~1.0 μ L 均可得到较好的扩增, 同时不同厂商不同批次的 Taq 酶对 RAPD 扩增有较大影响。因此, 应采用同批次的 Taq 酶进行 RAPD 试验。对于红景天 RAPD 来说, 在本实验室的 PCR 扩增仪型号和 RAPD 扩增程序与循环周期下, 采用 1.5 项下的 RAPD 扩增条件, 在扩增带型和清晰度上均获得很好的重复。为红景天 DNA 水平的遗传多态性分析和种类分子鉴定提供了科学依据。

2.3 红景天 DNA 水平多态性分析: 200 条引物经

筛选, 得到较好扩增的引物有 38 条, 共扩增检测到 302 个位点, 其中单态性位点 90 个, 多态性位点 212 个, 占 70.20%, 片段大小在 200~3 000 bp。根据 302 个位点的有无, 按 1.6 项下建立种系发生图(图 2)。可见大花红景天与长鞭红景天先聚为一支, 狭叶红景天与高山红景天聚为一支, 最后聚在一起, 说明大花红景天与长鞭红景天亲缘关系较近, 狭叶红景天与高山红景天亲缘关系较近, 而大花红景天、长鞭红景天与狭叶红景天、高山红景天亲缘关系较远。聚类结果与形态学分类相似, 但有差异。从植物体的叶形、根状茎等形态学特点分析, 大花红景天与狭叶红景天、高山红景天相近, 而与长鞭红景天亲缘关系较远。由于 RAPD 扩增的结果只能从相似性系数或遗传距离去做表征分析(表 3), 所得树状图不一定能真正反应种属间系统发育关系, 同时在种间的 DNA 变异水平很高, 用一个或几个个体代表一个种可能造成结果的很大偏差, 尤其是药用植物是针对有药用价值的分类单元进行分析。因此, 笔者认为在应用 RAPD 方法对药用植物种间亲缘关系的研究, 尤其是在对类似红景天这样的大属分类时, 要考虑形态学的差异以及前人的观点进行全面评价。

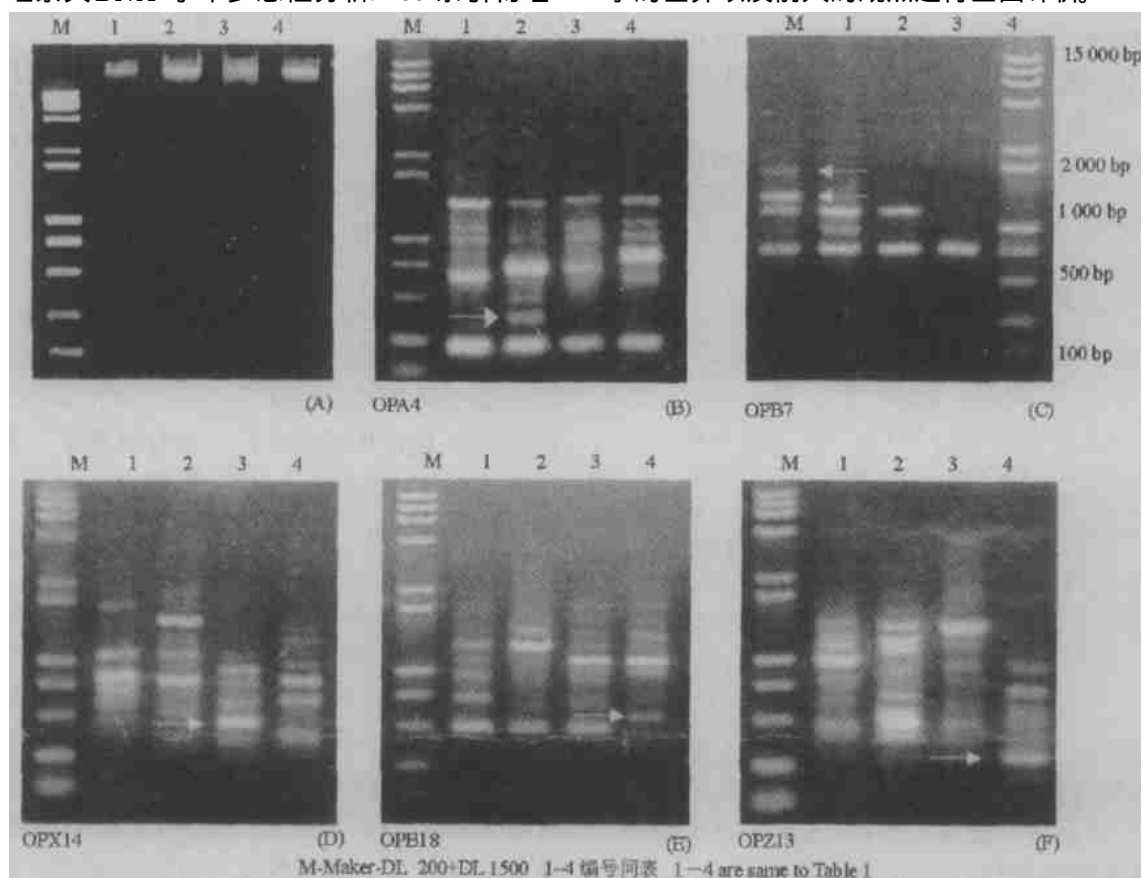


图 1 基因组 DNA 提取结果及扩增 DNA 指纹图谱

Fig 1 Result of DNA extracted and fingerprints of amplified DNA with RAPD primers

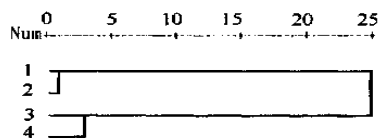


图 2 用遗传相似系数聚类分析产生的树状图

Fig 2 Dendrogram of four species in *Rhodiola* L. with GS analysis

表 3 4 种红景天的分类群间 Jaccard 遗传相似系数

Table 3 Jaccard genetic similarities (GS) of four species in *Rhodiola* L.

	1	2	3	4
1	1			
2	0.615	1		
3	0.556	0.547	1	
4	0.531	0.506	0.609	1

2.4 红景天的分子鉴定: 红景天植物来源复杂, 商品药材种类多。红景天各个种功用不一, 不同种之间替代使用, 用药混乱^[1,2]。因此, 对红景天药材的分类和正确鉴定就尤为重要。从红景天的 RAPD 扩增结

果显示用 OPA 4, OPB 7, OPB 18, OPX 14, OPZ 13 作引物可将大花红景天、长鞭红景天、狭叶红景天及高山红景天 4 种红景天属植物区分开, 每种红景天均有一特异片段扩增(图 1B~F)。这些结果得到了很好的重复, 其特有位点能够把这 4 种红景天区分开, 说明应用 RAPD 分析方法对红景天种类的鉴定是切实可行的。

References:

- [1] Jia G F. General study and its prospect on *Rhodiola* root [J]. *Sichuan Grassland* (四川草原), 1997, 03: 38-40.
- [2] Ni Z C. *Economic Plants of Xizang (Tibet)* [M]. (西藏经济植物). Beijing: Beijing Science Press, 1990.
- [3] Clark M. *Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual* (植物分子生物学实验指南) [M]. Beijing: China Higher Education Press Beijing and Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
- [4] Wang G L, Fang H J. *Plant Genetic Engineering* (植物基因工程) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [5] Lu W D. *SPSS for Windows Statistics* (SPSS for Windows 统计分析) [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2000.
- [6] Zou Y P. RAPD analysis of gemplasm in ancient "Taizi lotus" and modern Chinese lotus [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40(2): 163-168.
- [7] Wang X Q. Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1996, 38(12): 954-962.

甘肃陇西道地药材蒙古黄芪规范化栽培技术规程初步研究

陈志国¹, 马世震^{1*}, 陈桂琛¹, 张鼎新², 李 毅¹, 周昌范^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 甘肃省陇西县农业技术推广中心, 甘肃 巩昌镇 748100)

摘要: 目的 规范蒙古黄芪种植、加工, 使蒙古黄芪生产达到优质高产无公害的标准, 与国际接轨, 使中药走向世界。方法 通过对陇西县及其毗邻地区黄芪产区的种植历史、基本生态环境、种质资源、良种选育的调查和试验, 并取样对活性成分进行检测。结果 改变了产区传统生产中存在的不足, 形成了蒙古黄芪规范化种植规程。结论 通过规范化种植生产出来的蒙古黄芪具有优良的品质。

关键词: 蒙古黄芪; 规范化种植(SOP); 优质高产无公害; 种质资源

中图分类号: R 282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)11-1289-05

Standard operating procedure for *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* of domestic medicinal materials in Longxi, Gansu Province

CHEN Zhi-guo¹, MA Shi-zhen¹, CHEN Gui-chen¹, ZHANG Ding-xin², LI Yi¹, ZHOU Chang-fan¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Longxi Agriculture Extension Center of Gansu Province, Gongchangzhen 748100, China)

Abstract: **Object** To study the standard operating procedure (SOP) for *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Beg. Hsiao, so as to make its high quality, high yield, non-hazard, and

* 收稿日期: 2004-02-13

基金项目: 中国科学院兰州分院与甘肃省院地合作项目“甘肃省陇西黄芪 GAP 基地种植技术研究”课题; 科技部西部重大项目“中藏药材规范化栽培技术研究”; 中国科学院专题(KSCX2-1-01-2-03); 中国科学院“西部之光”人才培养计划“青藏铁路高海拔地区植物繁育及其栽培技术研究”专题

作者简介: 陈志国(1963—), 男, 吉林省公主岭市人, 中国科学院西北高原生物研究所副研究员, 硕士, 主要从事农作物育种和栽培研究。Tel: (0971)6143763; 13007793142 E-mail: czg0403@sina.com; zgchen@nwipb.ac.cn

* 通讯作者