

- "FENGDOU" and authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied species of *Dendrobium* Sw. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [8] Ding X Y, Xu L S, Xu H, *et al.* Morphological and DNA molecular evidence for authentication of *Dendrobium flexicaule* from ITS allied of *Dendrobium* Sw. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(11): 868-873.
- [9] Xu H, Li X B, Ding X Y, *et al.* rDNA ITS sequence of *Herb Dendrobii* (HUANGCAO) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(10): 777-783.
- [10] Zhang Y B, Wang J, Wang Z T, *et al.* DNA Microarray for identification of the herb of dendrobium species from Chinese medicinal formulations [J]. *Planta Med*, 2003, 69(12): 1172-1174.

不同薯蓣皂苷元的盾叶薯蓣遗传关系的 RAPD 分析

薛焱, 秦天才*, 张友德

(华中农业大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 从 DNA 水平分析鉴定不同薯蓣皂苷元盾叶薯蓣的遗传关系。方法 从 40 个 10 bp 随机引物中筛选出 12 个引物, 进行 RAPD 分析, 应用 POPGENE 1.31 软件对扩增结果进行聚类分析。结果 共扩增出 73 条 DNA 片段, 其中多态性片段 64 条, 占 87.67%, 盾叶薯蓣类型间具有明显的多态性差异。结论 DNA 分子多样性差异与薯蓣皂苷元量差异具有相关性, 说明盾叶薯蓣的遗传基础可能对薯蓣皂苷元的形成和积累有显著的影响。

关键词: 盾叶薯蓣; 遗传关系; RAPD

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0115-04

RAPD Analysis of genetic relationship among *Dioscorea zingiberensis* with different diosgenin

XUE Yan, QIN Tian-cai, ZHANG You-de

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To study the genetic relationship among *Dioscorea zingiberensis* with different diosgenin content at DNA level. **Methods** DNA of all types was amplified by 12 random primers from 40 random primers, the polymorphic bands of RAPD were counted. And the results of types were analysed by POPGENE 1.31 (Tool for Population Genetic Analysis 1.31) software. **Results** A total of 73 bands was obtained, 64 of total bands (87.67%) was polymorphic. The results indicated that there were apparent and abundant genetic variations in *D. zingiberensis*. **Conclusion** The formation and accumulation of diosgenin could be affected significantly by the genetic basis of *D. zingiberensis*.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; genetic relationship; RAPD

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 俗称黄姜, 为多年生缠绕草质藤本植物, 隶属于薯蓣科薯蓣属根状茎组, 为我国特有种。该属植物的根状茎中含有丰富的薯蓣皂苷元 (diosgenin), 是重要的甾体激素类药源植物, 盾叶薯蓣由于其含薯蓣皂苷元量高, 为我国主要药源植物, 也是世界上单株薯蓣皂苷元量最高的薯蓣种^[1]。目前盾叶薯蓣各品种薯蓣皂苷元差别很大, 各类型间除生物学特性等差异外, 迄今在遗传背景、亲缘关系及基因组 DNA 上的差异研究报道较少。DNA 分子水平上的

多态性检测技术是进行基因组 DNA 研究的基础。Williams 和 Welsh 1990 年几乎同时建立的随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析技术, 以其高效、快速、简便的特点, 用于药用植物研究, 从方法上更显示独到的优势, 它能够通过不同引物直接给出整个基因组的多态性信息, 避免了生长环境和发育时期不同的影响; 并从 DNA 水平上对分类群比较分析, 确定药用植物种、类型间的亲缘关系, 构建树状聚类图^[2]。本研究利用该技术对不同薯蓣皂苷元量的盾叶薯蓣类型

* 收稿日期: 2005-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30170098)

作者简介: 薛焱 (1974—), 女, 内蒙古人, 硕士阶段从事资源植物方面的研究, 现为内蒙古大学生命科学院 2005 级博士研究生, 研究方向为植物发育生物学。

Tel: 13704781063 E-mail: xyxy2172@163.com

* 通讯作者 秦天才 Tel: (027) 87281305 E-mail: qtc@mail.hzau.edu.cn

的基因组 DNA 进行多态性分析、从 DNA 分子水平上揭示各类型间遗传变异关系,帮助探索盾叶薯蓣中所含薯蓣皂苷元与遗传特性的关系,以期为盾叶薯蓣的品种鉴定及良种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料:本研究 14 个材料选自 2002 年从湖北丹江口、房县、陕西石泉等地区,收集的野生或半野生状态盾叶薯蓣,并种植于华中农业大学植物教研室盾叶薯蓣资源圃内,薯蓣皂苷元采用重量法^[3]测得,其主要工艺流程:盾叶薯蓣根状茎→选择、清洗→粉碎、过筛→发酵→酵解→滤过、洗涤→烘干滤渣→抽提→干燥→成品,称量薯蓣皂苷元的质量;并将另一部分根状茎样品洗净、切碎,80℃烘干测定其干重,最后计算各样品薯蓣皂苷元质量分数。盾叶薯蓣各样品的编号、原产地、薯蓣皂苷元量及生长年限见表 1。

表 1 用于 RAPD 分析的盾叶薯蓣材料

Table 1 Materials in <i>D. zingiberensis</i> used in RAPD analysis			
材料编号	原产地	薯蓣皂苷元/ %	生长时间/ 年
1	湖北丹江口	3. 198	2
2	陕西石泉	2. 400	2
3	湖北丹江口	2. 343	2
4	湖北房县	2. 332	2
5	陕西石泉	2. 308	2
6	湖北丹江口	2. 285	2
7	与小花盾叶薯蓣杂交种	2. 113	1
8	湖北八仙观	1. 866	2
9	湖北丹江口	1. 739	2
10	湖北丹江口	1. 672	2
11	湖北丹江口	1. 586	1
12	湖北松滋	1. 435	2
13	湖北竹山	1. 364	2
14	湖北丹江口	1. 140	2

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取:参考文献方法^[4]并加以改进。用蒸馏水把样品材料冲洗干净,用吸水纸吸去材料表面的水分。称取幼嫩叶片约 0.1~0.3 g,置于研钵,加 800 μL 2×CTAB (2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 14 mmol/L NaCl, 2% β-巯基乙醇) 提取液,充分研磨。取 1.0~1.5 mL 于离心管中,65℃水浴中置 30 min,每隔 5~10 min 混匀 1 次。加入等体积氯仿-异戊醇,轻轻摇动 20~30 min。12 000 r/min 离心 10 min,吸上清到一个新管中,并加入 2 倍体积的 95% 乙醇,混匀,于-20℃冰冻 20 min 左右。12 000 r/min 离心,去掉上清。加入 800 μL 75% 乙醇清洗沉淀。离心,倒掉上清,再次清洗。室温下吹干 DNA,加入 100 μL

TE 缓冲液和 2 μL Rnase。置于-20℃贮存备用。

1.2.2 DNA 的浓度和质量的检测:①琼脂糖凝胶电泳法:取 1 μL 提取的 DNA,加入 9 μL TE 染料,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭 (EB) 染色后,紫外分析仪上观察;④紫外分光光度计法:用蒸馏水将提取的 DNA 稀释 1 000 倍,在 Berkman DU 640 紫外分光光度计上测定 260 和 280 nm 处的吸光度值。1.2.3 引物及来源:筛选了上海生工生物公司生产的 RAPD 引物共 40 个,选择扩增条带丰富、信号强的 12 个引物进行 RAPD 正式实验。正式使用的引物序列及扩增结果见表 2。

表 2 筛选出的引物编号、序列和扩增结果

Table 2 Codes and sequences of selected primers and amplification results				
引物编号	寡核苷酸序列 (5-3)	扩增带数/ 条	多态性扩增带数/ 条	多态性百分数/ %
S10	CTGCTGGGAC	4	4	100. 00
S18	CCACAGCAGT	6	5	83. 33
S21	CAGGCCTTC	9	8	88. 89
S102	TCGGACGTGA	6	6	100. 00
S118	GAATCGGCCA	8	8	100. 00
S120	GGGAGACATC	8	6	75. 00
S201	GGGCCACTCA	5	5	100. 00
S216	GGTGAACGCT	6	5	83. 33
S301	CTGGGCACGA	5	5	100. 00
S307	GAGCGAGGCT	5	4	80. 00
S313	ACGGGAGCAA	6	4	66. 67
S319	TGGCAAGGCA	5	5	100. 00
总计		73	64	87. 67

1.2.4 PCR 反应:扩增反应在 20 μL 体系中进行,其中含 2.0 μL 10 倍 buffer,1.2 mmol/L dNTPs,1.6 mmol/L MgCl₂,0.2 μmol/L 的引物,1.0 U TaqDNA 聚合酶,50 ng 的模板 DNA,用双蒸水将体积补到 20 μL,用 25 μL 矿物油覆盖并加盖,DNA 扩增用 DNA Thermal Cycler (PT-200) 进行 42 个循环。扩增条件为:94℃ 3 min,94℃ 30 s,32℃ 1.5 min,72℃ 1.5 min;6 循环 94℃ 30 s,41℃ 45 s,72℃ 1.5 min;36 循环 72℃ 10 min;4℃ 保存;反应结束后,PCR 产物置 4℃ 冰箱中保存备用,或直接用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离,电泳缓冲液为 0.5 倍 TBE,在电压 100 V 下电泳,然后用 EB 染色,在紫外透色仪上成像,记录结果。每个 PCR 反应重复 3 次,Marker 用 MG0781。1.2.5 数据处理与分析:根据电泳图谱,把有带的量化为 1,无带的量化为 0,数据输入计算机标准化处理。利用 POPGENE 1.31 (tool for population genetic analysis 1.31) 进行数据的遗传分析,计算类型间的相似系数、遗传距离。根据遗传距离采用 UPGMA (unweighted pair group method with

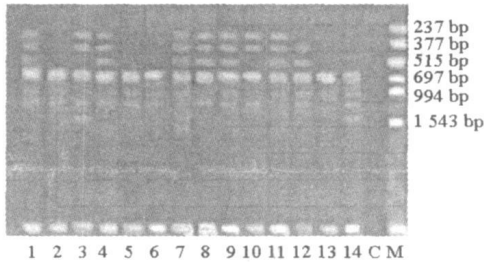
arithhmetic mean) 构建类型间的聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 供试材料的扩增结果及多态性分析: 从 40 个 10 bp 随机引物中筛选出的 12 个引物, 对 14 个盾叶薯蓣类型进行扩增反应, 得到良好的结果, 图 1 显示引物 S21 扩增反应的电泳图谱。通过分析发现 12 个引物共扩增出 DNA 片段 73 条, 扩增出的 DNA 片段分子量在 200 ~ 1 600 bp, 其中公共片段 9 条, 多态性片段 64 条, 占 87. 67%, 平均每个引物扩增 6. 1 条(表 2), 表明盾叶薯蓣各类型间具有丰富的遗传多样性。

2.2 盾叶薯蓣品种间的遗传相似系数和聚类分析: 根据 RAPD 分析结果, 计算出不同薯蓣皂苷元盾叶薯蓣类型间的遗传相似系数(表 3)。从表 3 可见, 含不同薯蓣皂苷元的盾叶薯蓣的遗传相似系数在 0. 4795 ~ 0. 8219, 表明含不同薯蓣皂苷元的盾叶

薯蓣具有较近的遗传关系, 同时其 DNA 也发生了一定的变异。其中 1 与 11 之间的遗传相似系数最大 (0. 821 9), 7 与 4 的遗传相似系数最小 (0. 479 5),



C-阴性对照 M-Marker
C-negative control M-Marker

图 1 用随机引物 S21 对各样品进行 RAPD 扩增 (样品编号同表 1)

Fig. 1 Randomly amplified DNA products by Primer S21 (Materials No. is same as in Table 1)

表 3 用 RAPD 标记计算出盾叶薯蓣 14 种类型间的遗传相似系数

Table 3 Similar coefficient and Nei's genetic distance of 14 types of *D. zingiberensis* by RAPD

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	***	0.726 0	0.739 7	0.712 3	0.753 4	0.739 7	0.493 2	0.643 8	0.767 1	0.643 8	0.821 9	0.657 5	0.616 4	0.767 1
2	0.302 2	***	0.821 9	0.575 3	0.808 2	0.712 3	0.520 5	0.643 8	0.712 3	0.698 6	0.794 5	0.602 7	0.753 4	0.684 9
3	0.301 5	0.196 1	***	0.561 6	0.767 1	0.643 8	0.479 5	0.602 7	0.671 2	0.657 5	0.808 2	0.589 0	0.630 1	0.698 5
4	0.339 2	0.552 8	0.576 9	***	0.712 3	0.671 2	0.479 5	0.547 9	0.589 0	0.547 9	0.616 4	0.643 8	0.547 9	0.589 0
5	0.283 1	0.212 9	0.265 1	0.339 2	***	0.712 3	0.411 0	0.534 2	0.712 3	0.616 4	0.739 7	0.575 3	0.616 4	0.767 1
6	0.301 5	0.339 2	0.440 3	0.398 6	0.339 2	***	0.534 2	0.602 7	0.671 2	0.630 1	0.726 0	0.643 8	0.657 5	0.643 8
7	0.706 9	0.652 9	0.735 1	0.735 1	0.889 3	0.626 9	***	0.630 1	0.589 0	0.657 5	0.506 8	0.561 6	0.630 1	0.506 8
8	0.440 3	0.440 3	0.506 3	0.601 6	0.626 9	0.506 3	0.461 8	***	0.739 7	0.726 0	0.602 7	0.712 3	0.671 2	0.520 5
9	0.265 1	0.339 2	0.398 6	0.529 3	0.339 2	0.398 6	0.529 3	0.301 5	***	0.794 5	0.643 8	0.671 2	0.684 9	0.698 6
10	0.440 3	0.358 6	0.419 3	0.601 6	0.483 8	0.461 8	0.419 3	0.320 2	0.230 0	***	0.575 3	0.602 7	0.698 6	0.575 3
11	0.196 1	0.230 0	0.212 9	0.483 8	0.301 5	0.320 2	0.679 5	0.506 3	0.440 3	0.552 8	***	0.643 8	0.657 5	0.753 4
12	0.419 3	0.506 3	0.529 3	0.440 3	0.552 8	0.440 3	0.576 9	0.339 2	0.398 6	0.506 3	0.440 3	***	0.684 9	0.534 2
13	0.483 8	0.283 1	0.461 8	0.601 6	0.483 8	0.419 3	0.461 8	0.398 6	0.378 4	0.358 6	0.419 3	0.378 4	***	0.602 7
14	0.265 1	0.378 4	0.358 6	0.529 3	0.265 1	0.440 3	0.679 5	0.652 9	0.358 6	0.552 8	0.283 1	0.626 9	0.506 3	***

Nei 氏遗传特性(斜上)和遗传距离(斜下)

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

14 个品种平均遗传相似系数为 0. 649 8。

根据 Nei's 遗传距离用 UPGMA 法聚类分析得到树状分析图(图 2)。从基于 RAPD 标记建立起的树状图来看, 所有供试材料的遗传距离都大于零, 这表明不同薯蓣皂苷元量的盾叶薯蓣之间既有相同遗传背景, 但相互之间又存在一定的差异。从图 2 可直观地看出, 有 4 个明显的聚类, 1、2、3、4、5、6、11 为 类群, 8、9、10、12、13 为 类群, 、 两个类群聚在一起后再与 14 和 7 逐级聚在聚类图上形成了 和 类群。从 类群可以看出, 薯蓣皂苷元量较高 (2. 285 ~ 3. 198) 的 1 ~ 6 及 11 这 7 个盾叶薯蓣品种间遗传相似系数大, 如 1 和 11、2 和 3 的遗传相似系数达 0. 821 9, 这些都说明 DNA 分子多样性差异

与含薯蓣皂苷元的量差异具有相关性, 所以盾叶薯蓣的遗传基础可能对薯蓣皂苷元的形成和积累有显著的影响。此类群中只有 11 的量稍微低了些, 那是因为 11 的生长时间为 1 年, 而其他类型均为两年生, 这可以用两年生根状茎中薯蓣皂苷元的量比一年生的明显要高的研究结果加以解释^[5]。 类群也可以看出, 大多品种来自湖北丹江口, 但也有来自湖北房县和陕西石泉的品种, 如 2、4 和 5, 这说明不同类型盾叶薯蓣与其原产地相关性不很明显, 也显示盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的量与其原产地相关性更不明显, 至于这是由产地之间发生过引种, 而有了类型间基因的交流造成的, 还是由各类型本来的基础决定的, 还需要进一步研究。另外, 从 类群也可以看

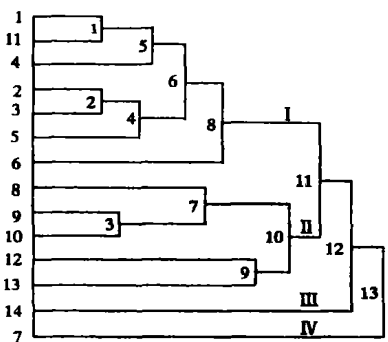


图 2 聚类分析结果

Fig. 2 Dendrogram of clustering analysis

出, 1 和 11 的亲缘关系最近, 这是由于它们是亲代与子代的关系, 但也可看出它们也出现了一定的变异。这可能可以用来解释盾叶薯蓣的品种退化、薯蓣皂苷元量不稳定等问题; Ⅰ类群也是薯蓣皂苷元量差别小的先聚在一起, 差别大的再聚在一起, 如 9 和 10、12 和 13 薯蓣皂苷元量差别很小分别聚在一起, 后又聚在一起, 从这里也可以看出 9、10 来自湖北丹江口, 可它们没有和 Ⅰ类群聚在一起, 这与黄春洪等^[6]认为的居群间的遗传距离呈现明显的地域性, 居群间地理距离越近, 遗传距离越小而聚为一类的研究结果不完全一致。Ⅱ、Ⅲ两个类群聚在一起后再与 14 形成 Ⅳ类群, 是由于 14 薯蓣皂苷元量比较低, 仅为 1.140, 而其他品种薯蓣皂苷元量都比 14 高, 所以遗传距离相对远了些。之后才与 7 形成 Ⅳ类群, 这是由 7 的遗传背景造成的, 7 是盾叶薯蓣 14 与小盾叶薯蓣的杂交种, 遗传相似系数 0.630 1。它与其他 13 个品种有 9 个扩增片段相同, 该品种长势旺盛, 薯蓣皂苷元量也明显比亲本高, 可对其进行进一步的研究。

3 讨论

传统分类方法与分子标记法本身存在一定的差

异, 传统分类方法认为相同地理来源类型的样品应聚为一类, 而在 RAPD 标记中却发现不同地理来源类型的样品聚为一类, 相同地理来源类型的样品分属于不同的类群。就本试验而言, 2、3 分别来自陕西石泉和湖北丹江口, 但亲缘关系近聚在一起; 9、10 虽来自湖北丹江口, 可它们没有和 Ⅰ类群聚在一起。这显示 RAPD 分子标记所构建的聚类图与传统分类印象有一定的差距, 这说明样品间遗传差异与形态、地理来源差异没有必然的联系^[7]。

另外, 实验中筛得的 12 个 RAPD 引物的扩增片段可能未覆盖样品基因组全长, 为得出更为可信的实验结果, 本实验可以筛得更多的引物, 进一步比较和分析一些特征性基因片段, 如果这些片段与盾叶薯蓣高皂苷元形成相关, 则可以进一步进行克隆、测序及转基因等研究, 这对于盾叶薯蓣优良品种的选育具有重要的意义。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Tomus 16(1)., Beijing: Science Press, 1985.
- [2] Shu Y Q, Bai S M, Chen Y H. The application of RAPD technology in the study of medicinal plant [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 147-151.
- [3] Wang Y L, Li S F, Yang Z. A New technology for extracting diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Econom Forest Res* (经济林研究), 2002, 20(2): 67-68.
- [4] Wang G L, Fang H J. *Principle and technology of plant gene engineering* (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [5] Cao Y F, Ling R, Hu Z H. Studies on the developmental anatomy of *Dioscorea zingiberensis* and its histochemistry [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2003, 21(4): 288-294.
- [6] Huang C H, Hang Y Y, Zhou Y F, et al. Population genetic structure of *Dioscorea zingiberensis* in China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25(6): 641-647.
- [7] Xu M H, Zheng M H, Liu G T. Genetic diversity in cultivars of *Nicotiana tabacum* revealed by RAPD markers [J]. *J Agric Biotechnol*, 1998, 6(3): 281-285.

欢迎订阅《中草药》杂志 2001 年增刊

2001 年第 32 卷增刊为“第三届中中药新药研究与开发信息交流会”会议论文集, 特邀了中国工程院院士、国内十多名专家和中青年学科带头人就加快中药现代化的进程、我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章 20 多篇, 另有反映近年来中花化学、药理分析、制剂、药材及临床等方面的科研论文和综述文章 140 多篇。

每本定价 60 元, 另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅, 款到寄刊。

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编: 300193 网址: www.tjipr.com

电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@tjipr.com