· 药材与资源 ·

不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析

白 音[1,2]，包英华[1]，王文全[2]，朱必凤[1]，阎玉凝[2]

(1. 韶关学院英东生物工程学院，广东 韶关 512005；2. 北京中医药大学中药学院，北京 100102)

摘 要：目的 分析不同居群美花石斛种质资源的遗传多样性、濒危现状以及亲缘关系。**方法** 利用 RAPD 分子标记技术和方法对不同居群美花石斛进行检测；通过计算遗传相似系数建立其聚类分析图。**结果** 从 117 个随机引物中，共筛选出 8 个有效引物，对 8 个美花石斛居群进行 RAPD-PCR 扩增，共扩增出 287 个条带，平均每个引物的扩增条带为 35.88 个；287 个条带共占据 78 个位点，其中 11 个位点是 8 个居群的共有位点，67 个为多态位点，多态性比率达 85.95%；8 个居群的相似性系数在 0.149～0.517。**结论** 美花石斛遗传多样性水平低于铁皮石斛种内遗传多样性水平；美花石斛的濒危原因与人为过度采收、种子自然萌发力弱和遗传多样性水平较低有一定的关系；美花石斛 8 个居群比较自然地向 3 个方向演化发展，并形成 3 个分支；美花石斛系统演化规律与其地理分布的相关性有待于进一步研究。

关键词：美花石斛；种质资源；遗传多样性；RAPD

中图分类号：R282.7 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2670(2007)05-0748-04

RAPD Analysis on germplasm resources in different populations of *Dendrobium loddigesii*

BAI Yin[1,2], BAO Ying-hua[1], WANG Wen-quan[2], ZHU Bi-feng[1], YAN Yu-ning[2]

(1. Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Objective To analyse the genetic diversity, endangered situation, and phylogenetic relationship of germplasm resources in different populations of *Dendrobium loddigesii* by RAPD. **Methods** Genetic diversity, phylogenetic relationship, and molecular authentication in different populations of *D. loddigesii* were investigated by the methods of RAPD markers and dendrogram of cluster analysis was established by calculating the genetic similar coefficient. **Results** A total of 287 bands with an average of 35.88 per primer were amplified from eight populations by eight effective primers, which selected from 117 primers. The 287 amplified bands took up 78 loci in all gelatin boards, among which 11 loci were monomorphic and 67 were polymorphic, corresponding to 85.95% genetic polymorphism. The similarity coefficients were from 0.149 to 0.517 in these eight populations of *D. loddigesii*. **Conclusion** Compared with *D. officinale*, the level of genetic diversity of *D. loddigesii* is distinctly lower. The reasons for *D. loddigesii* being on the brink of extinction are relevent to the artificial destroyed phenomenon, infirmly reproductive ability and lower genetic diversity of this species. The eight populations of *D. loddigesii* can be developed to three directions naturally according to their cluster dendrogram. It is necessary to further research whether the phylogenetic relationship of *D. loddigesii* will be related to its geological distribution.

Key words: *Dendrobium loddigesii* Rolfe; germplasm resources; genetic diversity; RAPD

美花石斛 *Dendrobium loddigesii* Rolfe 为兰科(Orchidaceae)石斛属多年生草本植物，又称环草石斛、粉花石斛或耳环石斛等，主要分布于贵州、广西、云南和广东等省区。美花石斛是我国常用名贵中药材，具有滋阴清热、益胃生津和润肺止咳等功效，主要含有多糖、生物碱和甾类等化学成分[1~3]。由于在

收稿日期：2006-08-10

基金项目：科技部国家科技基础条件平台项目(2004DKA30410)；韶关市科技计划项目(韶科 2005-10)

作者简介：白 音(1973—)，在读博士，主要从事中药材品种整理及资源评价研究。

Tel：(0751)8121376 E-mail：baiyin271@sohu.com

自然环境中，美花石斛的种子萌发率很低，再加上长期过度采收，导致野生美花石斛种质资源急剧减少，甚至难以找到较为完整的野生居群。于 1987 年出台的《国家重点保护野生药材物种名录》中，美花石斛（环草石斛）被列为国家三级珍稀濒危保护植物之一。笔者对云南、贵州、广西和广东等省区的美花石斛种质资源进行考察时发现不同产地美花石斛的外部形态特征具有一定的差异，说明种内可能存在较大变异。那么美花石斛种内遗传物质多态性水平到底如何，目前却尚未见到相关研究报道。本文采用 RAPD 分子标记技术对不同产地美花石斛种质资源进行遗传多样性和亲缘关系分析，为美花石斛种质资源的可持续利用和保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料：实验材料采自贵州、云南和广西等地区的野生美花石斛 *Dendrobium loddigesii* Rolfe，由北京中医药大学阎玉凝教授鉴定。共收集 8 个居群的样品（表 1），取幼嫩叶片 8～10 个，用变色硅胶快速干燥，存放于－70 ℃ SIM 型超低温冰箱（美国西蒙公司），备用。

表 1 用于 RAPD 分析的不同居群美花石斛

Table 1 Analysis of *D. loddigesii* in different populations by RAPD

居群编号	采集号	产 地
Dlod01	HCSH-GZ-XY-238	贵州兴义
Dlod02	HCSH-GX-JX-224	广西靖西
Dlod03	HCSH-GZ-QSH-218	贵州清水河
Dlod04	HCSH-GZ-ZF-245	贵州贞丰
Dlod05	HCSH-GZ-AL-201	贵州安龙
Dlod06	HCSH-GZ-ZR-237	贵州则戎
Dlod07	HCSH-GX-YL-228	广西玉林
Dlod08	HCSH-YN-WS-233	云南文山

1.2 基因组 DNA 的提取和检测：采用改进的 4×CTAB 法，制备模板 DNA。称取低温保存的不同居群美花石斛鲜叶 0.20 g，研磨后放入 5 mL 离心管中，加 1 mL 4×CTAB 溶液，混匀，冷却 10 min，室温溶解，4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min，弃上清液。在沉淀中加 1.5 mL 4×CTAB 溶液，65 ℃水浴 30 min，加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1），混匀 5 min，4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液，加 2 倍体积的无水乙醇，4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min，沉淀放在离心管中，用 70%乙醇清洗 2 次，室温，10 000 r/min 离心 2 min，DNA 沉淀，干燥后用 0.1×TE 溶解，4 ℃保存，备用。

精密吸取 10 μL，稀释至 1 mL，用 Ultrospec 2000 紫外/可见分光光度计，测定样品 DNA 吸光度，计算其质量浓度和质量分数。DNA 质量浓度（ng/mL）＝A_{260}×50×稀释倍数/1 000；以 A_{260} 与 A_{280} 的比值计算样品 DNA 质量分数，检测结果显示，A_{260}/A_{280} 均在 1.7～1.9。

1.3 引物筛选：本实验所用引物共 117 条（购自上海生工，分别从 S80～S200、S1001～S1020、S1341～S1360 和 S2101～S2160 引物中选用）。以贵州兴义居群为模板，对引物进行筛选，获得 50 个具有扩增条带的引物，在此基础上，进一步筛选出扩增条带多而清晰的 8 个引物，用于分析美花石斛种质资源的 RAPD 分析。

1.4 PCR 反应体系及产物检测：总体积为 25 μL，其中 10×Buffer 2.5 μL，Mg^{2+} 1.2 mmol/L，dNTPs 160 mmol/L，模板 DNA 用量 40 ng/mL，*Taq* 聚合酶 1.2 U，随机引物 0.3 mmol/L，ddH_2O 16.2 μL。扩增程序为 94 ℃预变性 3 min、94 ℃变性 50 s、40 ℃复性 1 min、72 ℃延伸 2 min，循环 40 次，最后 72 ℃延伸 5 min。反应产物以 100～3 000 bp ladder 为相对分子质量标记，1.8%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色 20 min。采用 Image Master VDS 凝胶成像系统（瑞士 Ameisham Pharmacia Biotech）观察记录。每个随机引物重复扩增 2 次 PCR，选取重复性和稳定性好的扩增结果用于统计分析。

1.5 数据的统计分析：根据 PCR 扩增条带在琼脂糖凝胶上的迁移程度，确定各居群 RAPD-PCR 条带的位置和相对分子质量大小。在某一个位点上，有带的样品记为“1”，无带记为“0”，所得的位点按相对分子质量从大到小排列。用 SPSS11.5 统计软件，计算 Jaccard 相似系数，用 hierarchical clustering analysis 方法进行聚类分析，构建不同居群美花石斛分子系统树。

2 结果

2.1 美花石斛种质资源的 RAPD 扩增结果：经多次重复筛选，在 117 个随机引物中，只有 8 个引物能够扩增出重复性较好、条带清晰，而且多态性丰富的条带。用这些引物，对美花石斛 8 个居群进行 PCR 扩增，并对扩增片段进行统计分析。结果显示，8 个引物共扩增出 78 个位点，67 个多态位点，约占总数的 85.95%，平均每个引物所扩增位点为 9.75，多态性位点数在 6～11，平均 8.38 个位点（表 2）。

2.2 美花石斛种质资源的多态性分析：利用筛选出的 8 个随机引物，对美花石斛 8 个居群进行 PCR 扩增，结果共扩增出 287 个条带，多态性条带有 199

表 2 8 个不同居群美花石斛随机引物的扩增结果

Table 2 Amplification results for primers in eight populations of *D. loddigesii*

引 物	引物碱基序列	位点总数	多态位点数	多态百分率/%
S90	AGGGCCGTCT	11	11	100
S107	CTGCATCGTG	7	6	85.71
S1001	TCCGCAACCA	8	8	100
S1016	CAAGGTGGGT	12	11	91.67
S1349	CCGATCCAAC	11	8	72.73
S2108	CCTGGGTCCA	10	8	80.00
S2117	CAAGCTCGTG	9	7	77.78
S2143	GGAGCAGCAA	10	8	80.00
总数		78	67	
平均数		9.75	8.38	85.95

表 3 美花石斛 8 个居群多态性分析结果

Table 3 Polymorphism for eight populations of *D. loddigesii*

居群编号	扩增条带总数	多态性条带数	多态性条带百分率/%
Dlod01	33	22	66.67
Dlod02	37	26	70.27
Dlod03	33	22	66.67
Dlod04	31	20	64.52
Dlod05	51	40	78.43
Dlod06	26	15	57.69
Dlod07	43	32	74.42
Dlod08	33	22	66.67
总数	287	199	
平均数	35.88	24.88	39.34

个，约占 69.34%。平均每个所扩增出的总条带和多态性条带数量分别是 35.88 和 24.88。在 8 个居群中，贵州安龙居群(Dlod05)多态性比率最高，为 78.43%，而贵州则戎居群(Dlod06)多态性比率最低，为 57.69%(表 3)，说明不同居群美花石斛种质资源的遗传变异显著。

2.3 美花石斛种质资源的聚类分析：以 Jaccard 相似性系数为依据，对美花石斛 8 个居群的基因组 DNA 的扩增条带的编码数据进行编码矩阵(表 4)和聚类分析，构建 8 个居群的聚类图(图 1)。从聚类图的拓扑结构可见，美花石斛8个居群比较自然地划分为 3 个分支(分支 A、分支 B 和分支 C)，分支 A 包括贵州清水河居群(Dlod03)、贵州贞丰居群(Dlod04)、广西靖西居群(Dlod02)、云南文山居群(Dlod08)；分支 B 包括贵州兴义居群(Dlod01)和贵州则戎居群(Dlod06)；分支 C 由贵州安龙居群(Dlod05)和广西玉林居群(Dlod07)组成。另外，从图 1 和表 4，还可以看到贵州清水河居群(Dlod03)和贵州贞丰居群(Dlod04)聚在一起，遗传距离很近，相似系数为 0.517；遗传距离最远的两个居群是贵州贞丰居群(Dlod04)和广西玉林居群(Dlod07)，相似系数为 0.149。

表 4 美花石斛 8 个居群相似性系数分析结果

Table 4 Similarity coefficient for eight populations of *D. loddigesii*

居群编号	Dlod01	Dlod02	Dlod03	Dlod04	Dlod05	Dlod06	Dlod07	Dlod08
Dlod01	1.000							
Dlod02	0.444	1.000						
Dlod03	0.343	0.500	1.000					
Dlod04	0.216	0.441	0.517	1.000				
Dlod05	0.383	0.438	0.362	0.216	1.000			
Dlod06	0.333	0.375	0.393	0.233	0.295	1.000		
Dlod07	0.239	0.356	0.244	0.149	0.423	0.225	1.000	
Dlod08	0.237	0.378	0.353	0.333	0.333	0.300	0.273	1.000

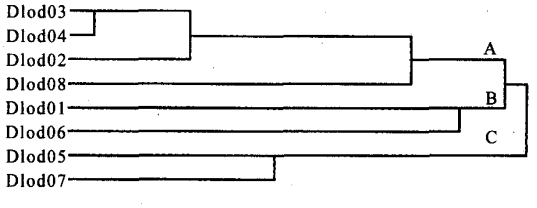

图 1 美花石斛 8 个居群的 RAPD 聚类分析图

Fig. 1 Dendrogram of RAPD cluster analysis for eight populations of *D. loddigesii*

3 讨论

3.1 美花石斛种质资源遗传多样性保护：关于石斛属植物遗传多样性研究报道较多，而且多数研究报道都选用 S 序列随机引物对石斛属植物进行分析。张铭等[4]利用 RAPD 技术分析了 26 种石斛属植物和 1 个金石斛植物的基因组 DNA 多态性分析，结果发现多态性条带占 91.2%；丁颉等[5]对铁皮石斛种内遗传多样性进行 RAPD 分析，结果显示铁皮石斛种内多态性比率能够达到 91.35%。由此看来，石斛属植物种间和种内遗传多样性水平比较高，这个在很多濒危物种中比较少见。本文分析结果显示，美花石斛 8 个居群的多态比率为 85.95%，低于铁皮石斛种内多样性水平和石斛属总体遗传多样性水平。笔者认为，美花石斛的濒危原因可能与其遗传多

样性水平相对较低有一定关系，因为美花石斛通常生长在悬崖峭壁或森林高大乔木之上，分布区域分散，居群间基因交流较少，自然有性繁殖率低；当然，长期以来过度采收野生美花石斛，致使其资源储量急剧减少；严重缩小分布区域，是美花石斛濒危程度加剧的另一个主要原因。今后有必要进一步加大野生美花种质资源的就地保护和迁地保护力度，建立美花石斛核心种质库，以防治美花石斛遗传基础的流失和降低。同时，要开展优质美花石斛品种的人工培育研究工作，建立规范化生产基地，为加快野生美花石斛种质资源的恢复能力，解决日益增加的社会需求。

3.2 美花石斛居群间亲缘关系的初探：通常认为，不同种或种内居群的相似度大小一定程度上反映这些类群的亲缘关系远近。从聚类图和相似性系数分析结果来看，亲缘关系最近的居群是清水河居群(D1od03)和贞丰居群(D1od04)，亲缘关系最远的两个居群是贵州贞丰居群(D1od04)和广西玉林居群。从清水河居群和贞丰居群地理分布看，美花石斛的亲缘关系与其地理分布似乎有一定的关系。然而，实际上，兴义居群、安龙居群和贞丰居群的地理位置很近，而它们的相似性系数却很低。由此看来，美花石斛系统演化规律与其地理环境的相关性程度有待进一步研究。

References:

[1] Li M F, Hirata Y, Xu G J, *et al*. Studies on the chemical constituents of *Dendrobium loddigesii* Rolfe [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1991, 26(4): 307-310.

[2] Li M F, Xu G J, Hirata Y, *et al*. Content determination of polysaccharides in medicine of *Dendrobium* species [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(10): 10-12.

[3] Qin H L, Zhang J X, Wang Z T, *et al*. Analysis of ^{1}H-NMR fingerprint in stem of *Dendrobium loddigesii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(12): 919-923.

[4] Zhang M, Huang H R, Liao S M, *et al*. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(7): 442-447.

[5] Ding G, Ding X Y, Shen J, *et al*. Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2005, 40(11): 1028-1032.

山西芮城引种白菊花中主要有效成分的比较研究

薛黎明[1]，秦雪梅[1*]，郭吉刚[2]

(1. 山西大学化学化工学院，山西 太原 030006；2. 山西生物应用职业技术学院，山西 太原 030031)

摘 要：目的 以白菊花内总氨基酸、总黄酮、绿原酸和挥发油等有效成分为指标，探索山西芮城白菊花质量与采收期、加工方法的关系并与原产地白菊花比较质量。**方法** 运用水蒸气蒸馏法测定挥发油的量，采用分光光度法测定总黄酮和总氨基酸的量以及 HPLC 法测定绿原酸的量。**结果** 胎菊除绿原酸外各指标显著高于各花期，可作为高等茶饮，普通茶饮品以半开菊和盛开菊适合，产量较高，指标适合。加工方法以机械加工更快、更适宜大生产。**结论** 白菊花质量与采收期和加工方法有很大的关系。山西引种白菊花主要有效成分的量与原产地相当；挥发油量受采收期和加工方法的影响大于产地环境影响。

关键词：白菊花；总氨基酸；绿原酸；总黄酮

中图分类号：R282.6 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2007)05-0751-04

Comparative study on main components of *Chrysanthemum morifolium* introduced in Ruicheng in Shanxi Province

XUE Li-ming[1], QIN Xue-mei[1], GUO Ji-gang[2]

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
2. Shanxi College of Bio-application Vocational Technology, Taiyuan 030031, China)

Abstract: Objective Taking the total amino-acid, total flavones, chlorogenic acid, and volatile oil in *Chrysanthemum morifolium* as index to investigate the internal quality which relates to collection periods and processing methvods in order to compare the quality of species from oringinal habitats. **Methods** The

收稿日期：2006-07-12

*通讯作者 秦雪梅 教授 Tel：(0351)7011202 E-mail：qinxm@sxu.edu.cn