

• 药材与资源 •

巴戟天遗传多样性的 RAPD 研究

丁 平, 刘 瑾, 仰铁锤, 邱金英

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘 要:目的 应用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术对广东产 5 个类群的栽培巴戟天进行遗传多样性研究。方法 应用 15 种引物对 64 个个体进行检测, 应用 Popgen32 软件分析群体的遗传多样性。结果 共得到 224 条带, 其中多态位点 112 个, 多态百分率为 50.00%。种群内多态位点百分率在 37.05%~53.13%, 平均为 45.86%。Shannon 指数和 Nei 指数均反映出巴戟天各类群遗传多样性有一定的变化。Shannon 指数为 0.287 6, 各类群的 Shannon 指数在 0.103 3~0.236 2, Nei 指数为 0.175 6, 各类群的 Nei 指数在 0.074 5~0.154 0。结论 目前栽培巴戟天居群间有一定的分化, 并产生了多种农家类型, 其中小叶巴戟天 (POP2) 遗传多样性明显高于其他类型, 这些可能是导致目前栽培巴戟天质量产生变异的主要原因。

关键词: 巴戟天; 遗传多样性; RAPD 分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)12-1869-04

Genetic diversity of *Morinda officinalis* by RAPD

DING Ping, LIU Jin, YANG Tie-chui, QIU Jin-ying

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity of five populations of cultivated *Morinda officinalis* in Guangdong Province using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Methods** Sixty-four individuals in five populations of cultivated *M. officinalis* were analyzed by RAPD markers to determine the genetic variations among the populations. The data of genetic diversity were analyzed with Popgen32 software. **Results** The levels of genetic variation and patterns of population structure in *M. officinalis* were investigated using RAPD markers. Of the 100 primers screened, 15 primers produced highly reproducible RAPD bands, using these primers, 224 discernible DNA fragments were generated with 112 (50.00%) polymorphic fragments, indicating considerable genetic variation at the species level. In contrast, there were relatively high levels of polymorphism at the population level with the percentage of polymorphic bands ranging from 37.05% to 53.13%, and the mean percentage of polymorphic loci ($P=45.86\%$). Genetic variation among populations was detected based on Nei's genetic diversity analysis (0.175 6), Shannon's diversity index (0.287 6) for every population with Shannon's index 0.103 3—0.236 2 and Nei's indexes 0.074 5—0.154 0. **Conclusion** There is a little genetic differentiation among populations of cultivated *M. officinalis* and result in different cultivated types, the genetic diversity with *M. officinalis* (POP2) is higher than that of other populations. It may be the main reason of the difference of cultivated *M. officinalis* quality.

Key words: *Morinda officinalis* How; genetic diversity; RAPD analysis

巴戟天 *Morinda officinalis* How 是茜草科植物巴戟天属多年生灌木, 其根具有温补肾阳、强筋壮骨、祛风除湿等功效^[1], 系“四大南药”之一, 其主产地为广东肇庆、高要等地区。目前由于市场需求量的增大, 野生资源逐渐减少并趋于濒危状态^[2], 药材市场上出售的多为栽培的巴戟天。自 20 世纪 60 年代

栽培种植成功以来, 巴戟天已具有 50 多年的栽培历史, 但由于常年的扦插繁殖, 巴戟天遗传多样性受到较大的影响, 再加上生态环境的影响造成了许多遗传分化, 笔者在研究过程也发现在巴戟天的类群中存在较多外观和化学成分变异^[3,4], 为此, 本研究利用 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 技术对广东

收稿日期: 2008-06-25

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (04010057) 及重点项目 (06105061), 国家科技支撑计划子课题 (2006BAI06A11-02)

作者简介: 丁平 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源和药材质量评价的研究。

E-mail: dingpinggz@126.com

不同区域栽培巴戟天 5 个类群 64 个个体的遗传多样性进行研究,并对种群间的遗传关系进行初步探讨,为这一药用植物的物种保护、品种选育和质量评价研究提供实验遗传学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:实验材料分别采自于 2007 年 6~9 月,采集幼嫩的叶片置于硅胶中快速干燥后,用于 DNA 提取,样品经鉴定均为巴戟天 *M. officinalis* How,凭证标本存于广州中医药大学中药资源研究室,采样原则均按文献记载的方法^[5],样品均来自不同的居群,共 64 份(表 1)。

表 1 巴戟天取样的居群及取样位置

Table 1 Population and sampling sites of *M. officinalis*

居群	农家类型的名称	地点	采样数目
POP1	大叶	德庆县云利村	13
POP2	小叶	德庆县云利村	18
POP3	类圆	德庆县永丰	13
POP4	长叶	德庆县永丰	9
POP5	圆叶	德庆县播植	11

1.2 仪器和试剂:PE9600 型 PCR 仪,RNA/DNA 测定仪(GENEQUANT—80—2103—98,英国),电泳凝胶图像成像分析系统(EDAS120,美国),高压垂直电泳仪(PAC3000,BIO-RAD);*Taq* DNA 聚合酶,BSA 等均由大连宝生物工程有限公司提供。随机引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取:用 CTAB 法提取样品 DNA,并参照文献^[6],取样品适量,加入已灭菌的石英砂适量,研磨成细粉,将粉末转入 1.5 mL 离心管中,加入预冷的提取介质 1 mL(含 0.2 mol/L 的 Tris-HCl, 50 mmol/L 的 EDTA, 0.25 mol/L 的 NaCl, pH 8.0),混匀,在 0 ℃ 下放置 10 min,在 7 000 r/min 下离心 10 min,收集沉淀;加入预热的 2×CTAB 1 mL(含 1.4 mol/L 的 NaCl, 1 mol/L 的 Tris, 20 mmol/L 的 EDTA, 20 g/L 的 CTAB, pH 8.0; 65 ℃),混匀;在 65 ℃ 下保温 30~60 min(中间摇匀几次),7 000 r/min 下离心 10 min;取上清液至灭菌离心管中;加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),摇匀;在 10 000 r/min 下离心 10 min;取上清液至灭菌离心管中;加入 2 倍体积的预冷异丙醇,摇匀;在 -20 ℃ 下放置 30 min 或者过夜;离心,弃上清液。沉淀用 70% 乙醇冲洗沉淀 3 次,超净台内风干。沉淀用 DEPC 处理水溶解,取 DNA 溶液 10 μL,用 RNA/DNA 测定仪测其浓度及纯度。并根据其质量浓度将其稀释至 50 ng/μL 并分装,置 -20 ℃ 冰柜中保存备用。并取适量用 0.8% 琼

脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.4 PCR 扩增:从 100 个 RAPD 随机引物中筛选出 15 个具有较高多态性的引物进行 PCR 扩增。参考文献^[7]确定其扩增反应总体积为 20 μL。其中含:模板 DNA 为 50 ng,10×Loading Buffer 2.0 μL,BSA 1.0 μL(20 g/L),Mg²⁺ 1.0 μL,dNTP 混合物 0.8 μL(各 2.5 mmol/L),*Taq* 0.2 μL(5 U/μL),引物 0.5 μL(20 pmol/μL),其余用 DEPC 处理水补足至 20 μL。其 PCR 扩增程序为:预变性:94 ℃,2 min;扩增循环(40 循环):94 ℃,30 s,37 ℃,2 min,72 ℃,2 min;延伸:72 ℃,5 min。扩增后于 4 ℃ 保存。

扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,在凝胶成像系统上观察并照相记录。

1.5 数据处理:RAPD 为显性标记,同一引物的扩增产物在电泳中迁移相同的条带被认为是同源性的,按条带的有无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0,形成二元数据矩阵。用 Popgen32 软件进行数据分析。采用算术平均数的非加权成组配对法(unweighted pair group method with arithmetic mean,UPGMA)进行聚类分析。

2 结果

2.1 引物筛选:实验所用 100 个 10 碱基随机寡核苷酸引物,购置上海生工生物工程技术有限公司。取两个模板 DNA,对所有引物做初步筛选,从中选出 15 个扩增条带清晰、重复性好的引物,筛选出引物的碱基序列(表 2)。

表 2 用于 RAPD 的 15 个随机引物序列

Table 2 Sequence of 15 random primers used in RAPD analysis

引物	序列(5'-3')	引物	序列(5'-3')
BA0450	TCAGAGCGCC	BA1076	CTGCGTGCTC
BA1032	GACGCGAACC	BA1056	TCTGGACCGA
BA1092	CCCAGGCTAC	BA0038	AGGTGACCGT
BA1060	ACACGTGGTC	BA1029	TCGCTGGTGT
BA1030	TCGGGGCATC	BA1025	GTCGTAGCGG
BA0204	CACAGAGGGA	BA1051	GAACGCTGCC
BA1059	ACAGTGGCCT	BA1096	CTTTCGAGGG
BA1039	GGCAAAGCTG		

2.2 多态位点百分率:利用 15 个引物对 5 个巴戟天种群 64 个个体的 DNA 样品进行 RAPD 分析(图 1),共扩增出 224 个条带,各种群的多态位点百分率有较大差异(表 3),小叶巴戟天(POP2)种群最高,为 53.13%;其次是大叶巴戟天(POP1)(50.27%);长叶巴戟天(POP4)最低(37.05%);平均为 45.86%。5 个种群 64 个个体共产生 224 个多态位点,多态百分率为 50.00%。

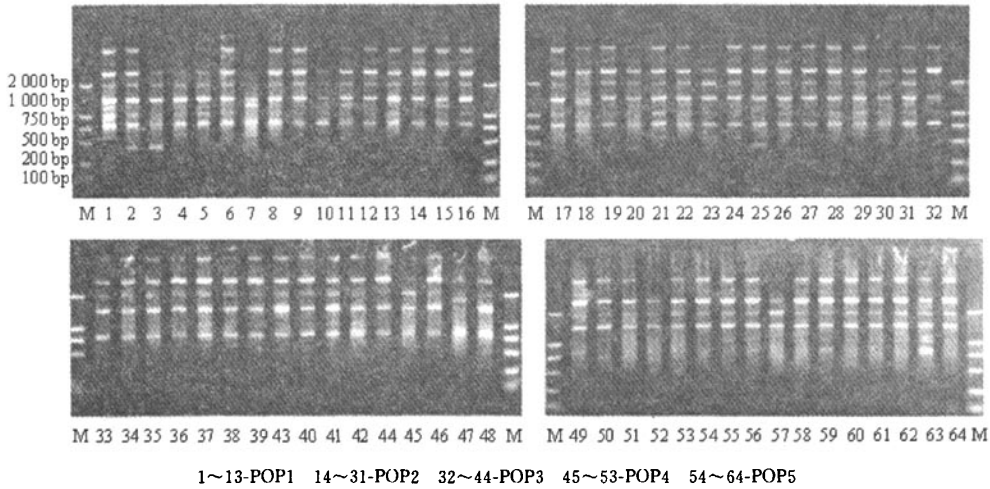


图 1 引物 0450 对 POP1~5 类群的扩增结果

Fig. 1 Amplified products from POP1-5 samples of *M. officinalis* using Primer 0450

2.3 Nei 指数、Shannon 信息指数:由 Nei 指数和 Shannon 信息指数估计的巴戟天 5 个类群的基因多样性见表 3,两者估计的不同种群的遗传多样性的高低是一致的,Nei 指数遗传多样性的变动范围为 0.074 5~0.154 0,Shannon 信息指数的变动范围为 0.103 3~0.236 2。

表 3 巴戟天种群内多态位点比率及种群间遗传多样性
Table 3 Percentage of polymorphic loci and genetic diversity within populations of *M. officinalis*

类群	采样数	总数	多态位 点数	多态位 点率/%	Nei's 指数	Shannon's 信息指数
POP1	13	224	113	50.27	0.154 0	0.236 2
POP2	18	224	119	53.13	0.142 5	0.223 5
POP3	13	224	107	47.77	0.120 1	0.176 4
POP4	9	224	83	37.05	0.074 5	0.103 3
POP5	11	224	92	41.07	0.101 4	0.144 7
总计	64	224	112	50.00	0.175 6	0.287 6

2.4 种群间的遗传一致度和遗传距离:按 Nei 方法计算巴戟天种群间的遗传距离和遗传相似度结果,见表 4。结果表明,5 个种群的遗传相似度在 0.891 9~0.987 2。其中大叶巴戟天种群 POP1 与小叶巴戟天 POP2 种群遗传相似度最高,长叶巴戟天种群 POP4 与圆叶巴戟天种群 POP5 遗传相似度最低。种群间的遗传距离最高为 0.114 4 (POP4 与 POP5),最低为 0.012 9 (POP1 与 POP2)。

2.5 种群的聚类分析:通过 Popgen 软件按 Nei's 的遗传距离,对 5 个种群进行聚类(见图 2),结果表明,种群间遗传距离与地理距离有一定的相关性,同一地区,地理相隔很近的种群间,存在着广泛的基因交流,遗传分化最小。根据聚类结果,大叶巴戟天与小叶巴戟天种群聚在一起,在调查中也发现,这两类

巴戟天是在同一地区经常出现的相近的巴戟天。而长叶巴戟天与圆叶巴戟天是两类较少见的类型,并且常常分布在不同的区域。

表 4 巴戟天不同种群的遗传相似度(对角线上方)与遗传距离(对角线下方)

Table 4 Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among different populations of *M. officinalis*

类群	POP1	POP2	POP3	POP4	POP5
POP1		0.987 2	0.951 3	0.922 4	0.929 6
POP2	0.012 9		0.948 2	0.920 9	0.928 8
POP3	0.049 9	0.053 2		0.910 3	0.946 1
POP4	0.080 8	0.082 4	0.093 9		0.891 9
POP5	0.073 0	0.073 8	0.055 4	0.114 4	

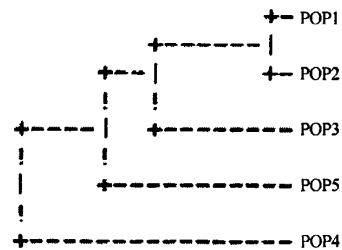


图 2 巴戟天居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA Dendrogram for populations of *M. officinalis* based on Nei's genetic distance

3 讨论

巴戟天为“四大南药”之一,20 世纪 60 年代末,由于野生资源破坏,产量急剧下降,导致巴戟天大面积种植,在广东德庆巴戟天基本上以扦插繁殖为主。植物的遗传多样性与其生物学特性、生境、分布范围、生活型以及花粉和种子传播方式影响较大^[8]。

Popgene 软件计算所得的 Nei's 多样性分析结果、Shannon's 信息指数表现出的分化系数表明,从总体上来看,巴戟天的不同农家类型间虽存在较大的遗传分化,但各类群的多态位点百分率较高(50.00%),有研究表明,对于植物物种水平和居群水平上的遗传多样性而言,多态条带比率在 50% 左右被认为遗传多样性是丰富^[9,10],由此看出,巴戟天各类群间具有较高的遗传多样性。物种保护的主要内容中其遗传多样性及进化潜力的保护,种群遗传多样性或变异越丰富,物种对环境变化的适应能力越强,其进化潜力也愈大,因此,遗传多样性对于物种的生存和发展具有决定性作用,物种保护策略的制定必须建立在对种群遗传结构及多样性分析了解的基础上,基于巴戟天种群遗传结构分析,建议采取下列措施进行保护:(1)由于种群间遗传分化程度较高,任一种群遗传多样性的丢失均会导致遗传变异的降低,因此,需就地保护所有种群,并在此基础上恢复各种群规模,并保护其生境,促进其更新。(2)迁地保护取样时,应考虑等位基因的丰富度,避免近交衰退,根据自然种群的遗传结构取样,防止栽培种群的遗传均一化。另外,可考虑建立种质资源库,最大限度地保护巴戟天不同类群的遗传多样性资源。

在巴戟天的主产地广东德庆实地调查中还发现,另外一种假巴戟天(当地名为“巴戟公”,巴戟天的混伪品),该植物叶型较大,地下根部皮部较薄,木心较粗;而同属的植物鸡眼藤也是在巴戟天种植基

地中经常发现的近缘植物,外型与巴戟天极其相似。巴戟天是多年生的藤本,世代周期长,且雌雄同花,自然条件下主要靠花粉来传播,这在一定程度上影响了基因的流动,在种植过程中巴戟天是否与这些植物花粉杂交而产生目前不同的农家类型,有待进一步深入探讨。

在前期的研究中发现,不同种质资源的巴戟天在药材的外形及化学成分指纹图谱等方面均存在较大的差异^[3,4],其中与巴戟天在栽培过程中发生的遗传分化有直接的关系,因此,为了保证药材的质量,应结合化学成分研究,对巴戟天不同类群的种质资源进行优选,以保证药材的质量。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 傅立国著. 中国植物红皮书(稀有濒危植物)第一册[M]. 北京:科学出版社, 1991.
- [3] 丁平, 楚桐丽, 徐吉银. 巴戟天不同种质资源的化学成分指纹图谱技术研究[J]. 华西药学报, 2006, 21(1): 12-14.
- [4] 詹若挺, 丁平, 潘超美, 等. 巴戟天规范化种植基地不同农家类型的调查和比较研究[J]. 广州中医药大学学报, 2003, 20(1): 72-75.
- [5] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [6] 高三红, 张军丽, 丁平, 等. 无多糖巴戟天基因组 DNA 提取物的制备[J]. 热带农业科学, 2003, 23(4): 22-24.
- [7] 丁鸽, 丁小余, 沈洁, 等. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别[J]. 药学报, 2005, 40(11): 1028-1032.
- [8] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92.
- [9] 马小军, 汪小全, 徐昭玺, 等. 人参不同栽培群体遗传关系的 RAPD 分析[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 587-590.
- [10] 孙坤, 陈纹, 马瑞君, 等. 子午岭中国沙棘亚居群的遗传多样性研究[J]. 兰州大学学报, 2004, 40(3): 72-75.

不同水分和氮素条件对栽培绞股蓝生物量和皂苷量的影响

龙云¹, 杨睿², 钟章成¹, 谈锋^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要:目的 研究人工栽培条件下水分和氮素对绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 生物量和皂苷量的影响。方法 对野生绞股蓝扦插苗进行水分和氮素控制实验。结果 在干旱和缺氮逆境下, 整株植株生物量减少, 但由于 β -糖苷酶活性降低, 导致单位干质量叶片中绞股蓝皂苷的量增加。由于干旱使生物量减少的速率大于对皂苷积累的促进作用, 表现为干旱使总皂苷产量降低, 与之相反, 缺氮对生物量减少的速率小于对皂苷积累的促进作用, 但是氮素浓度过低也不利于皂苷积累。结论 这意味着在人工种植的情况下, 必须保证充足的水分供应和适度的氮肥供应才有利于绞股蓝生长, 保持较高的生物量和总皂苷产量。

收稿日期: 2008-05-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370279, 30670334); 西南大学科技基金资助项目(2001-Q12)

作者简介: 龙云(1973-), 男, 四川成都人, 讲师, 博士研究生, 主要从事植物种群生态学及药用植物生理生化研究与教学工作。

Tel: (023) 68367060 Fax: (023) 68252365 E-mail: longyr@swu.edu.cn

* 通讯作者 谈锋 Tel: (023) 68252698 Fax: (023) 68252365 E-mail: tanfeng@swu.edu.cn