

吴茱萸 RAPD 体系构建及道地性遗传背景研究

曹亮¹, 李顺祥^{1,2}, 魏宝阳³, 黄丹¹, 徐菲¹, 佟志远¹

(1. 湖南中医药大学药学院 中药现代化重点实验室, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药研究院中药研究所, 湖南长沙 410013; 3. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要:目的 建立吴茱萸的 RAPD 分子标记技术并对吴茱萸的道地性遗传背景进行探讨。方法 应用试剂盒法提取吴茱萸基因组 DNA; 筛选 RAPD 引物; 对全国 3 个省市 5 个吴茱萸产区采取的 48 份样品进行 RAPD 分子标记, 应用 NTSYS-PC 软件进行聚类分析。结果 获得了吴茱萸的 RAPD 分子标记方法; 通过对 RAPD 扩增结果进行聚类分析, 发现不同品种吴茱萸差异较大, 浏阳地区的吴茱萸和其他石虎品种在相似度系数为 0.68 时聚集为两个类群; 而同一品种的石虎遗传背景差异明显, 在相似度系数为 0.78 时, 铜仁、浏阳、建德、温州的样品各自聚集在相同地域的族群。结论 吴茱萸遗传背景差异明显, RAPD 技术是一种可用于吴茱萸道地性遗传背景分析的有效手段。

关键词: 吴茱萸药材; RAPD; DNA; 道地药材

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0975-04

Optimizing RAPD reaction system and authentic genuineness related genetic background of *Fructus Evodia*

CAO Liang¹, LI Shun-xiang^{1,2}, WEI Bao-yang¹, HUANG Dan², XU Fei¹, TONG Zhi-yuan¹

(1. Key Laboratory of Modernization of Chinese Materia Medica, College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China; 3. College of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Objective To establish molecular marker method of RAPD and to probe into the genetic background of *Fructus Evodia*. **Methods** Genomic DNA of *Fructus Evodia* was extracted by the DNA extraction kit method and then chose the RAPD primer; RAPD Analysis on 48 individuals of *Fructus Evodia* from three provinces have been done. The NTSYS-PC software was used to do cluster analysis. **Results** RAPD Analysis method was optimized for *Fructus Evodia*. RAPD Cluster analysis revealed that variety in different kinds of *Fructus Evodia* was significant. *Evodia rutaecarpa* from Liuyang and *E. rutaecarpa* var. *officinalis* from other places gathered in two populations at the similarity coefficient of 0.68. In the similarity coefficient of 0.78, the samples from Tongren, Liuyang, Jiande, and Wenzhou gathered in clusters, the same as their region ethnic groups, respectively. **Conclusion** Genetic background of *Fructus Evodia* from varies of regions is obviously different and RAPD analysis is a good manner to probe geo-authentic crude drug *Fructus Evodia*.

Key words: *Fructus Evodia*; RAPD; DNA; geo-authentic crude drugs

吴茱萸为芸香科植物, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 性热, 味辛、苦; 有小毒。具温中散寒、理气止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效。吴茱萸果实中含挥发油、脂肪酸、生物碱等多种化学成分。临床用于治疗偏头痛、湿疹、高血压、溃疡性口腔炎、消化不良

等。吴茱萸主产贵州、湖南、浙江等省, 主要有 3 个品种, 吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 和石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang。

①收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BA109B02); 国家自然科学基金资助项目(30973877); 湖南省科学技术厅科技项目(2008SK3087)

作者简介: 曹亮(1985-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为天然药物资源、分子生药学。E-mail: caoliang520945@126.com

* 通讯作者 李顺祥 Tel: (0731) 88458229 88807173 E-mail: lishunxg@yahoo.com.cn

其中石虎和疏毛吴茱萸合称小花吴茱萸, 吴茱萸称大花吴茱萸。应用 RAPD 技术^[1] 进行遗传背景的研究已经非常普遍^[2-4], 并可见将该技术应用于道地药材的初步研究^[5,6]。本实验拟建立和改进吴茱萸的 RAPD 反应体系, 并对全国低纬度 3 省 5 个地区的吴茱萸进行遗传背景研究, 并探讨了各产区间与产区吴茱萸道地性相关的遗传背景差异。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料: 吴茱萸于 2008 年 6 月采集于贵州铜仁、湖南新晃、湖南浏阳、浙江建德、浙江温州, 用随机采集方法获取样品, 采集部位为枝端嫩叶, 样品经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 和吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth., 分别标号, -80 °C 超低温冰箱保存, 样品采集情况见表 1。

表 1 材料采集情况

Table 1 Materials acquisition list

植物名	产地	编号	海拔范围/m
石虎	贵州铜仁	TR1~ TR5	662~ 672
石虎	湖南新晃	XH1~ XH2	417~ 454
吴茱萸	湖南浏阳	LY1~ LY10	105~ 115
石虎	湖南浏阳	LY11~ LY18	105~ 115
石虎	浙江建德	JD1~ JD4	51~ 57
石虎	浙江温州	WZ1~ WZ19	80~ 273

1.2 仪器: PCR 仪(T-Gradient Thermoblock, Biometra); 超低温冰箱(U410 Ultra low temperature freezer, Premium); 高速冷冻离心机(D-78532 Tuttlingen, hettich zentrifugen, Mikro 22R); 高温灭菌锅(HVE-50, HIRAYAMA); 超纯水系统; PL5124 Purelab Plus UV/UF PALL; 凝胶成像系统(Gel Doc 1000 Single, Wavelength Mini-T ransilluminator, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)。

1.3 试剂: RAPD 随机引物在上海捷瑞生物工程有限公司合成; *Taq* DNA Polymerase, 100 bp ladder, dNTP, 植物 DNA 快速提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖为 BIOWEST AGAROSE, 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 吴茱萸基因组 DNA 的提取: 利用天根生化科技有限公司的植物 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 并稍加改进。将 GP1(提取缓冲液) 700 μL 加入到约 0.05 g 液氮研磨粉中, 水浴 40 min, 然后用酚-三氯甲烷-异戊醇(25: 24: 1) 20 °C 14 000 r/min 10 min 抽提一次, 再用三氯甲烷-异戊醇

(24: 1) 20 °C 14 000 r/min 10 min 抽提, 吸取上清, 用 GP2 溶液混合, 然后按试剂盒操作, 并用 100 μL TE 洗脱, 加入 3 U RNase A, 置室温 30 min, -20 °C 保存样品。

2.2 RAPD 引物筛选: 对初始 66 条 RAPD 引物进行 PCR 扩增, 反应体系: Sterile deionized water 19.5 μL; 10 × PCR Buffer(含 20 mmol/L Mg²⁺) 2.5 μL; 10 mmol/L dNTP 0.5 μL; 10 pmol/L Primer 1.0 μL; *Taq* DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.5 μL; DNA 模板 1.0 μL; 总体积 25 μL。反应程序: 94 °C、3 min; (94 °C、30 s, 36 °C、50 s, 72 °C、90 s)(40 个循环), 72 °C 延伸 8 min, 16 °C 保温。扩增产物取 6 μL 上样, marker 为 100 ladder, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统上拍照, 观察, 选择带型分布均匀, 条带清晰, 多态性较好的引物进行道地性遗传背景分析。

2.3 道地产区吴茱萸遗传多样性分析

2.3.1 RAPD 遗传多样性分析: 用选择的引物对 48 份不同产地共两个品种的吴茱萸进行 RAPD 扩增, 电泳检测, 得到各引物的多态性图谱。

2.3.2 数据分析: 记录凝胶图谱上 100~ 2 500 bp DNA 条带的有或无, 条带清晰可辨的记为“1”, 缺失或模糊不清的记为“0”, 将观察的结果以 Excel 形式输入计算机, 用 NTSYS-pc 2.0 软件进行数据转换, 得到 NTS 数据表, 用 similarity 项下的 qualitative data 按 SM 进行数据计算, 所得数据表再在 clustering 项下按加权配对法(UPGMA) 进行 SAHN 聚类分析。

3 结果与分析

3.1 RAPD 引物筛选: 对 66 条引物进行筛选, 从中选择了 8 条引物用于吴茱萸遗传背景的研究。见表 2。

表 2 用于吴茱萸多态分析的引物

Table 2 Primers used for polymorphic analysis of *Fructus Evodia*

编号	引物名称	序列	主带数
29	S85	5' CTGAGACGGA3'	10
30	S119	5' CTGACCAGCC3'	8
36	S157	5' CTACTGCCGT3'	9
38	S193	5' GTCGTTCTG3'	8
40	S324	5' AGGCTGTGCT3'	9
41	S325	5' TCCCATGCTG3'	9
44	S351	5' ACTCCTGCCA3'	10
56	S380	5' GTGTCCGAG3'	5

3.2 RAPD 多态性分析: 通过应用 8 条引物进行扩增, 获得了谱带清晰, 多态性良好的图谱, 其中 41 号引物的部分扩增效果见图 1。8 条引物扩增的条带共

68 条,其中多态性的条带 47 条,多态性达 68.1%。通过应用 ntsys-pc 2.0 版遗传分析软件,进行聚类分析,得到样品的遗传聚类分析结果见图 2。

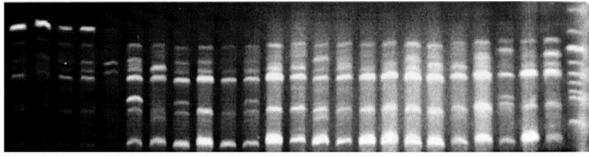


图 1 44 号引物扩增 TR1~ 5、WZ1~ 19 号样品的效果
Fig 1 Results of samples TR1- 5 and WZ1- 19 amplified by 44th Primer

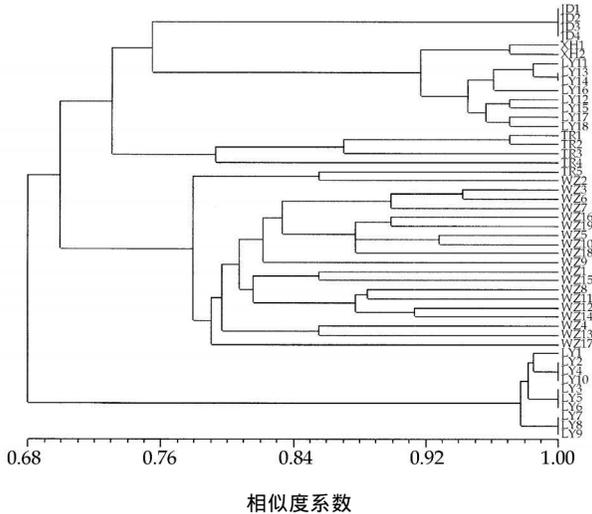


图 2 吴茱萸 RAPD 聚类分析

Fig 2 RAPD Clustering analysis of *Fructus Evodia*

聚类后发现不同吴茱萸品种间差异能明显区分,浏阳的吴茱萸(LY1-10号)在相似度系数为0.68时与其他石虎样品聚在不同的两类,品种不同,遗传背景差异最大。在相似度系数为0.70时温州(WZ)石虎与建德(JD)、新晃(XH)、浏阳(LY1-18号)的石虎、铜仁(TR)的石虎聚集为两个类群,温州的石虎和其余地区的石虎遗传背景差异较大;在0.73的水平上,建德、新晃和浏阳的石虎聚为一类与铜仁(TR)石虎可以区分开,即铜仁地区与其余3个地区石虎差异明显;在0.76的水平上,建德石虎、新晃浏阳石虎、铜仁石虎、温州石虎、浏阳吴茱萸聚集为5个类群,除新晃外各地的吴茱萸品种能按地区不同聚集在一起(在0.92时,新晃与浏阳的石虎可区分开),可见各地区吴茱萸遗传背景差异较明显,而RAPD技术能对此进行区分。同产区同品种内部差异不一致,浏阳、建德地区差异很小,如浏阳石虎在0.94的水平,吴茱萸在0.97的水平;但铜仁和温州样品遗传背景地区内差异比较大,都约为0.79,温州样品遗传背景最为复杂。由聚类图可知,

在0.84水平上,可分为8个不同的小类,差异显著。铜仁5号(TR₅)与温州2号(WZ₂)在0.78的水平时聚为一类,与温州其他样品差异较大,推测TR₅和WZ₂为石虎变种。

4 讨论

吴茱萸药材其原植物来源主要有3个品种,但变种及易混品较多,单从植物形态较难鉴别,而通过其遗传背景差异的分析,可以明显区分不同品种甚至变种。可见RAPD技术可以用于不同品种来源的吴茱萸药材的鉴别。不同品种的吴茱萸其遗传背景差异较大,这可能导致药材质量的差别,实践生产中也证实小花吴茱萸即石虎的果实药效比大花吴茱萸即吴茱萸的果实好。可见通过应用RAPD分子标记技术选择品种,有助于道地药材品种控制和规范化种植。

从聚类分析结果可知吴茱萸同一品种(石虎)地区间的差异大而地区内的差异为次,即不同地区吴茱萸在遗传本质上存在较为明显的差异,且贵州铜仁道地产区遗传背景与其他地区存在明显差异,可见不同生境对吴茱萸的遗传特性影响较大。浙江温州的样品生长于临海山地多风的环境,海拔起伏较大,个体遗传背景差异较大,推测小环境对石虎植株的遗传特性的影响不能忽视。RAPD技术可有效对各产区的遗传背景进行区分,并能区分道地产区与非道地产区的样品,对于药材道地性的鉴别研究有一定参考价值。

铜仁作为公认的吴茱萸道地产区,栽培历史悠久,遗传多样性很丰富,这一方面能提供丰富的基因型,有利于种群的遗传稳定性,可能产生更多高产高效的变异植株;另一方面,遗传背景差异太大,对于种质资源的控制可能更加复杂。铜仁产吴茱萸药材药效甚良,被广泛接受为道地药材,而遗传背景差异较大,个体变异丰富;温州地区的样品遗传背景差异也较大,变种较多;湖南浏阳种植基地的吴茱萸,虽两品种之间的遗传背景差异较大,但种内的差异小,品种稳定,因此可从这3个地区遗传差异和药用价值出发,结合药材有效成分、遗传特性和生境等指标,对铜仁、浏阳、温州地区进行对比研究,获得吴茱萸道地性的全面系统的评价和检测方法,为吴茱萸的规范化种植及合理区划提供科学依据。

致谢:实验于2008年在湖南农业大学作物基因工程省重点实验室进行,陈信波教授和周小云副研究员给予指导。

参考文献:

[1] Williams J G K, Kubelic A R, Livak K J. DNA Polymor-

- phisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acid Res.*, 1990, 18(22): 6531-6533
- [2] 朱永宏, 李学敏, 韩宝玲. RAPD 技术在中药材鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2007, 38(9): 附 7-8
- [3] 魏瑜. RAPD 技术在中药材道地性鉴定中的应用 [J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 148-150
- [4] 唐学芳, 蒋舜媛, 孙辉, 等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1387-1392
- [5] 肖小河, 史成和, 李隆云, 等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定 [J]. 中草药, 2000, 34(3): 209-212
- [6] 李颖, 李劲平. 广霍香道地性的 RAPD 研究 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(13): 2027-2028

佛手和属间药用植物的主成分聚类分析及 HPLC 指纹图谱研究

崔红花^{1,2}, 郭娇², 高幼衡¹, 沈志滨², 陈超²

(1 广州中医药大学 中药化学教研室, 广东 广州 510405; 2 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究佛手及属间药用植物化橘红、广陈皮的亲缘关系, 同时建立了 HPLC 指纹图谱。方法 运用 HPLC 法对佛手同属的 3 种药用植物进行测定, 对其进行主成分分析及聚类分析, 实现了预分类, 制定了原料药材的选择方法。结果 测定了样本的 HPLC 的色谱峰, 从获得的 17 个不同产地的佛手药材的 HPLC 指纹图谱比较, 结果从检测出 17 个分离度良好的共有指纹峰可以看出它们之间的相似性良好, 说明佛手这一植物所含的化学成分分布及比例较稳定; 使用 SPSS 分析软件, 采用欧氏距离进行聚类分析, 样品的聚类结果理想, 19 个样本可聚为 8 类, 即样本 1、7~10 和 15 处于一类, 样本 2 和 3 处于一类, 样本 4、14、16 和 17 处于一类, 样本 5、6 和 11 处于一类, 样本 12 和样本 13 分别单独处于一类, 而同属药用植物化橘红(样本 18) 和广陈皮(样本 19) 分别单独处于一类, 可较明显地与佛手样品区分。结论 将佛手及其属间 3 种药用植物的中药指纹图谱及主成分聚类分析相结合, 丰富了中药鉴定的理论内容。

关键词: 佛手; 主成分聚类分析; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0978-07

Principal component cluster analysis for *Citrus medica* var. *sarcodactylia* fruits and fingerprint identification of medicinal plants in *Citrus* L

CUI Hong-hua^{1,2}, GUO Jiao², GAO You-heng², SHEN Zhi-bin², CHEN Chao²

(1 Department of Phytochemistry, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2 College of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To compare the affiliation of *Citrus grandis* var. *tomentosa* fruits and *C. reticulata*, and establish HPLC fingerprint. **Methods** *C. medica* var. *sarcodactylia* fruits and three medicinal plants in *Citrus* L. were measured by HPLC method, which can be used to carry out principal component analysis and cluster analysis of the pre-classification of medicinal raw materials, and develop an initial method of selection. **Results** The HPLC chromatographic peaks of *C. medica* var. *sarcodactylia* and its adulterants were determined so as to obtain HPLC fingerprint comparison on *C. medica* var. *sarcodactylis* fruits and its adulterants from 17 different habitats. The similarity between them showed a good description of chemical distribution in this plant and stable proportion. By using the SPSS analysis software and Euclidean distance cluster analysis, sample clustering results were satisfactory. Nineteen samples can be clustered into eight categories, namely 1, 7-10, and 15 samples in a class, the samples 2 and 3 in a class, samples 4, 14, 16, and 17 in a class, samples 5, 6, and 11 are in a class, the samples 12 and 13 alone in a class, adulterants *C. grandis* var. *tomentosa* (sample 18) and *C. reticulata* (sample 19) left alone in a class, respectively. So it can be more obvious distinction between samples of *C. medica* var. *sarcodactylia* fruits. **Conclusion** The Chinese materia medica (CMM) fingerprint of *C. medica* var. *sarcodactylia* fruits

①收稿日期: 2009-10-22

基金项目: 国家“十五”重大科技专项“创新药物和中药现代化”资助项目(2001BA701A38); 广东省科技厅重点项目(2004B33001010)

作者简介: 崔红花(1976-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药及中药制剂的分析研究与资源开发。

Tel: 13710768642 E-mail: honghuacui@163.com

* 通讯作者 高幼衡 Tel: (020)39358083 E-mail: gaoyouheng@yahoo.com.cn