

石斛属植物遗传多样性 RAPD 分析

张建勇, 袁佐清, 刘 涛

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘 要:应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对石斛属植物 16 个种进行了基因组 DNA 多态性分析。从 82 个随机引物中筛选出 20 个多态性好的引物进行 RAPD 扩增, 扩增 DNA 片段数据用 UPGMA 聚类法构建系统发育树。20 条引物共扩增出 142 条带, 多态性带 118 条, 约占总数的 83.1%。聚类结果显示 RAPD 分子标记构建的系统发育树与经典分类系统一致。RAPD 标记可为石斛属植物的系统分类研究提供分子生物学依据。

关键词: 石斛属; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: S 682.31; S 603.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)07-0134-03

石斛属(*Dendrobium* Sw.) 是兰科植物中的第二大属, 全世界约有 1 500 种, 主要分布于亚洲热带、亚热带地区和太平洋岛屿。我国有 74 个种和 2 个变种, 主要分布于秦岭淮河以南的云南、四川、贵州、广西、广东、台湾等诸省^[1]。石斛是我国传统贵重中药材, 药用历史悠久, 民间的药用石斛属植物约有 39 种^[2]。由于石斛属植物集药用和观赏于一体, 导致过度采挖利用, 加上生态环境的破坏、繁殖率低和生长缓慢等特点, 1987 年已被国家列为濒危绝灭的植物药材之一。

DNA 分子标记技术的应用使中药材研究与鉴定深入到分子水平, 并已广泛用于药用植物遗传多样性、系统学、分类学研究和中药材鉴定等方面。在 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术基础上发展起来的随机扩增

多态性 DNA (random amplified polymorphic DNAs, RAPD), 在遗传多样性的检测、基因定位、品系鉴定和系统研究等诸多领域^[3]得到成功地应用, 但有关中药石斛的研究报道不多^[4]。为此, 运用 RAPD 分析技术, 对 16 种石斛进行研究, 以确定它们之间的遗传差异和种间亲缘关系, 同时对 RAPD 技术在石斛属植物分类鉴定应用的可行性进行了探索, 为石斛属植物系统学研究提供分子生物学依据与参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用石斛植物采自我国石斛主产区: 云南、安徽、广东、贵州等省区的原始森林, 现被整丛栽种于山东理工大学生命科学院植物组织培养实验室以便及时

表 1 试验材料来源及采集地

编号	材料	采集地点	编号	材料	采集地点
1	兜唇石斛 <i>D. aphyllum</i>	云南勐腊	9	海南石斛 <i>D. hainanense</i>	云南勐海
2	晶帽石斛 <i>D. cristaclinum</i>	云南勐海	10	肿节石斛 <i>D. pendulum</i>	云南思茅
3	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	云南景洪	11	独角石斛 <i>D. unicum</i>	广东曲江
4	大包鞘石斛 <i>D. wardianum</i>	云南勐腊	12	金钗石斛 <i>D. nobile</i>	四川合江
5	曲茎石斛 <i>D. flexicaule</i>	河南伏牛山	13	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	安徽霍山
6	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	云南高黎贡山	14	报春石斛 <i>D. primulinum</i>	云南思茅
7	细叶石斛 <i>D. hancockii</i>	云南文山	15	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	贵州荔波
8	球花石斛 <i>D. thyrsiflorum</i>	云南勐腊	16	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	云南勐海

取材和观察(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 取各样品新鲜原植物的叶片, 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[5], 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计下检测其

浓度, 最后稀释标定到 10 ng/ μ L, 放入 -20℃ 冰箱里储存备用。

1.2.2 RAPD 反应体系 PCR 反应在 PTC-200 型梯度热循环仪上进行, PCR 反应体系: 扩增反应总体积为 25 μ L, 其中包括 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L TrisHCl (pH 9.0), 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 50~100 ng 基因组 DNA, 1 U Taq 聚合酶和 0.1 μ mol/L 引物。PCR 扩增程序为 94℃ 变性 5 min; 94℃ 1 min, 38℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 42 次, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 Alpha2200 凝胶成像

第一作者简介: 张建勇 (1977-), 男, 讲师, 主要从事植物资源和遗传多样性研究, Email: zhangjy1977@126.com。

收稿日期: 2007-03-12

系统观察结果。

1.2.3 引物的筛选 RAPD 引物由上海生物工程公司合成。用上述样品 DNA 对上海生物工程有限公司(Sangon)的 RAPD 引物共计 82 条进行筛选,多态性带的选择以 DNA 扩增片段至少在 1 个种出现,且在其它种至少有 1 个不出现为准。从中选择扩增谱带清晰且呈多态性的引物用于所有试验样品的扩增。

1.2.4 RAPD 指纹图谱的数据处理 对扩增产物选取条带清晰、重复性好的进行记录,每个样品的扩增带按有或无记录。“有”赋值为 1,“无”赋值为 0。根据 Nei 的公式计算品种间 Nei' S 标准遗传距离(D)^[9]。根据 RAPD 多态性的标准遗传距离,应用 NTSYS(3.0)软件,按照非加权平均距离法(UPGMA)对 16 个品种群进行聚类分析,构建聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选和扩增结果

82 组随机引物中,有 19 个引物无扩增带或扩增带不清晰;43 个引物有扩增带,但有的重复性不好,稳定性差,有的扩增带清晰,但无多态性;20 个引物均能扩增出清晰、重复性好的多态性带。共扩增出 142 条带,其中多态性带有 118 条,占总数的 83.1%,单态位点 34 个,占 23.94%。各引物检测到的 RAPD 位点数不尽相同,在 4~10 之间,平均每个引物可检测出 7.1 个位点(表 2),表现出丰富的遗传多样性。RAPD 标记片段的大小在 200~2 000 bp 之间(图 1)。

2.2 聚类结果分析

在由 142 个 RAPD 标记获得的 Nei 氏相似系数矩阵中,各种间的相似系数分布在 0.186~0.605 之间,平均相似系数为 0.443,遗传多态性较丰富。采用 UPGMA 法建立了 16 个石斛品种的聚类分析图(图 2)。

表 2 RAPD 引物的多态性

引物	扩增带数	多态性带	引物	扩增带数	多态性带
A05	9	8	H05	6	6
A20	4	4	H13	7	6
C13	8	7	H16	4	3
C15	10	8	H19	10	8
C18	6	4	I04	9	7
G03	7	5	I06	8	6
G05	5	4	I10	10	8
G06	5	4	N08	8	6
G10	6	6	N13	6	6
H02	9	7	N15	5	5

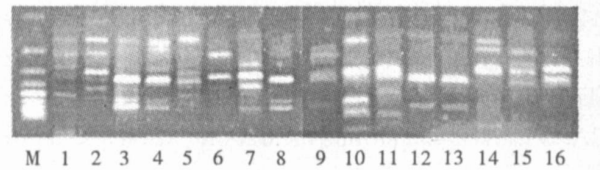


图 1 引物 OPG05 扩增的 RAPD 图谱

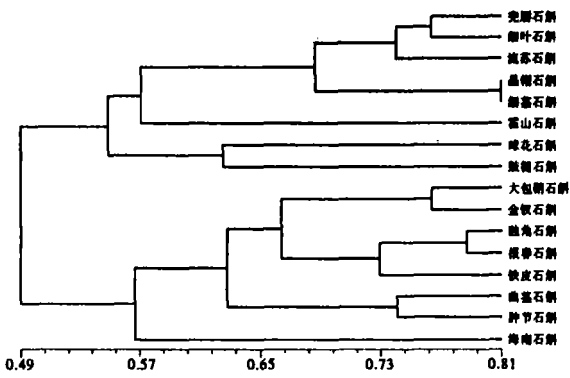


图 2 基于 RAPD 数据的石斛属植物遗传分化聚类图

由图 2 可见,取相似系数 0.63 时,试验材料分为 5 个类群。第一类包括石斛组的兜唇石斛、细叶石斛、流苏石斛、晶帽石斛、细茎石斛;石斛组霍山石斛单独划分为第二类;第三类是顶叶组的球花石斛和鼓槌石斛;第四类包括石斛组的大包鞘石斛、金钗石斛、独角石斛、报春石斛、铁皮石斛、曲茎石斛和肿节石斛;第五类是圆柱叶组的海南石斛。在石斛植物形态分类方面吉占和曾把我国石斛属的 57 个种划分为 9 个组^[1],它们分别为剑叶组、圆柱叶组、禾叶组、心叶组、基肿石斛组、草叶组、黑毛组、顶叶组、大花石斛组。现绘制的 16 种石斛聚类图可见,研究在分子水平上的 RAPD 聚类结果与经典的形态分类学结果基本一致。不过在 0.57 处时,也存在与经典分类学结论不完全吻合的,顶叶组的球花石斛和鼓槌石斛以及圆柱叶组的海南石斛分别与石斛组聚为两类,这还需要进一步的探讨。

3 讨论

3.1 药用石斛属植物的利用与保护

石斛是贵重药材,应用历史悠久。现代药理研究表明,石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强人体免疫力及扩张血管的作用^[7],因此石斛在临床上及中药复方中被广泛应用。石斛药材来源主要依赖于野生资源,但由于石斛对环境的要求十分严格,再加上过度采挖及环境的恶化,药材资源日趋枯竭。为保护利用这一珍稀中药材,有学者进行了石斛组织培养快速繁殖研究,并取得了一定的进展^[8],已在多种石斛中成功培育出试管苗,试管苗移栽成活率也得到了大幅度提高。今后应加强石斛的基础性研究,掌握石斛生长发育的营养需求、物质合成与分解等新陈代谢规律,确定石斛类群生长的最佳生态环境,应用现代生物技术和现代农业技术,从根本上解决石斛资源短缺问题。

3.2 RAPD 技术在石斛属植物系统分类的应用

石斛经长期的异花授粉和自然选择,其遗传背景非常复杂,某些种之间的形态特征相差甚远。中药石斛类药材基源复杂,混乱现象严重。由于 RAPD 技术简单、快速、灵敏度高,对研究材料的数量要求少及质量要求低等特点,因而受到人们的广泛关注。陆嘉惠等^[9]利用 RAPD 技术对国产甘草属植物进行分析,结果显示 RAPD 分子标记构建的系统发育树与经典分类系统一致, RAPD 技术可用于甘草属植物系统分类研究提供分子生物学依据。

为此,我们采用了 RAPD 方法对石斛属植物进行了鉴定。研究从 82 个随机引物中筛选出 20 个有效引物进行 DNA 扩增,共产生 142 个 DNA 片段,平均每个引物扩增 7.1 个 DNA 片段,显示出丰富的遗传多样性,这与形态分类结果基本一致。但 RAPD 检测到的仅是石斛基因组的部分位点,因此需积累更多的 RAPD 检测位点并结合其它 DNA 分析技术对其系统分类与亲缘关系做出更科学的评价。

3.3 石斛属植物研究展望

将组织培养技术用于石斛品种快繁、复壮和优良品种培育,在开发利用、挽救珍稀濒危石斛种类等方面具有重要作用。同时成熟的组织培养体系也是进一步遗传转化的基础,随着组织培养技术在石斛植物中的广泛应用,石斛基因工程研究也将取得很大进展。Chang 等^[10]将兰花花叶病毒(CMV)外壳蛋白(CP)基因用微粒轰击石斛的原球茎的方法进行基因转移,在含有潮霉素的培养基上选择转化株,PCR、Southern、Northern 以及 Western 杂交分析证实了转基因的存在,病毒侵染试验表明转化株的症状明显低于非转化株。

功能基因是药用植物基因组研究的最活跃领域之一。在药用植物功能基因研究中,与基因组 DNA 和

EST 研究相比,最为活跃的研究领域是与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基因克隆研究。石斛碱为石斛主要药用有效成分之一,目前已能进行人工合成,但成本很高。因此石斛碱相关功能基因的获得,是利用基因工程大量生产石斛碱的基础。因此获得具有自主知识产权、功能明确和有应用前景的功能基因,将在阐明中药或复方的作用机制,为中药现代化并走向国际市场,带动相关制药产业的发展,为人类健康事业的发展等方面做出贡献。

参考文献

- [1] 吉占和. 中国石斛属的初步研究[J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 427-449.
- [2] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [3] 肖小河, 刘峰群, 史成和, 等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药, 2000, 31(3): 201-212.
- [4] 刘石泉, 余庆波, 李小军, 等. 霍山石斛种内遗传稳定性的 RAPD 初探[J]. 中草药, 2005, 36(3): 427-431.
- [5] 彭锐, 宋洪元, 李泉森, 等. 石斛总 DNA 的提取及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1129-1131.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical models for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1979(76): 5269-5273.
- [7] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥. 鼓槌石斛中化学成分对肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(2): 1-3.
- [8] 卢文芸, 唐金刚, 乙引, 等. 五种药用石斛快速繁殖的研究[J]. 种子, 2005, 24(5): 23-25, 28.
- [9] 陆嘉惠, 李学禹, 马森, 等. 国产甘草属植物的 RAPD 分析及其分类学研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 527-531.
- [10] Chang C H, Chen Y Ch, Hsu Y H, et al. Transgenic resistance to Cymbidium mosaic virus in Dendrobium expressing the viral capsid protein gene[J]. Transgenic Research, 2005(14): 41-46.

Analysis and Classification of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) Plants in China by RAPD

ZHANG Jian-yong, YUAN Zuo-qing, LIU Tao

(School of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049)

Abstract: RAPD was employed to probe genetic differences of 16 species of *Dendrobium*. 20 primers with good polymorphism screened from 82 random primers were used to conduct RAPD analysis and dimorphic data of DNA fragments were used to construct the dendrogram by UPGMA. Totally 142 bands were amplified and 118 of them were polymorphic accounting for 83.1%. Clustering results revealed that the dendrogram constructed with RAPD molecular makers was identical with the classic taxonomic system. *Dendrobium* plant are rich in genetic diversity and different populations in the same species vary much in genetic differentiation. The RAPD markers can provide the basis for taxonomic researches of *Dendrobium* plants.

Key words: *Dendrobium*; RAPD; Genetic diversity