

东北地区香茶菜属植物遗传多样性的 RAPD 分析

张 博, 刘 翠 晶, 刘 霞

(吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以东北地区不同产地的 24 份蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜样品为试材,采用 RAPD 分子标记技术对其进行遗传多样性分析。结果表明:从 60 条随机引物中筛选出 5 条引物用于 2 种香茶菜的扩增,2 种香茶菜共扩增得到 63 条清晰条带,其中 55 条为多态性条带,多态性比率为 87.30%。系统聚类分析结果表明,2 种香茶菜亲缘关系明显,遗传多样性较丰富,且种间大于种内。因此,RAPD 分子标记技术可以作为研究香茶菜属植物遗传多样性的有效标记方法。

关键词:蓝萼香茶菜;尾叶香茶菜;RAPD;聚类分析

中图分类号:Q 949.95 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0087-04

唇形科香茶菜属植物 [*Rabdosia* (BL.) Hassk.] 在全世界约有 150 种,我国约有 90 种 21 个变种,是该属植物资源最丰富的国家^[1]。东北地区有 2 种,即蓝萼香茶菜 [*Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara] 和尾叶香茶菜 [*Rabdosia excise* (Maxim.) Hara]。2 种香茶菜在吉林省的分布尤为丰富,多生长在向阳山坡、路边、林间等地^[2-3]。香茶菜属植物在民间多作药用,用于清热解毒、活血破瘀、抗菌消炎、抗癌、治疗各种肝炎等^[4]。对于这 2 种香茶菜属植物的研究,国内外多有报道,主要集中在其化学成分、药理和毒理作用等方面^[5-9]。该研究利用随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记技术对东北地区不同产地的 2 种香茶菜的自然群体的遗传多样性进行研究,以期从分子水平研究其适应环境变化的能力,为更好的开发、利用和保护现有的野生植物资源奠定基础,也为这一药用植物人工栽培提供相关理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜采于 2012 年 6~8 月,蓝萼香茶菜采自吉林省的长白县十二道沟、磐石市烟筒山和延吉市帽儿山,尾叶香茶菜采自吉林省长白县十二道沟、磐石市烟筒山和辽宁省丹东凤凰山(表 1)。每个样地每种香茶菜分别采摘 4 株新鲜幼嫩叶片,每株植株间隔 10 m 以上,装入冰盒带回实验室,处理干净后置于 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。

第一作者简介:张博(1987-),女,吉林松原人,硕士研究生,现主要从事药用植物资源学和生态学研究。E-mail:zb1987523@qq.com

责任作者:刘霞(1965-),女,吉林长春人,博士,副教授,现主要从事中药资源的分类和调查与栽培技术的研究工作。E-mail:Liuxia651015@163.com

收稿日期:2013-01-17

表 1 采样地地理位置

采样地(采样地代号)	样本数	经度	纬度	海拔/m
长白十二道沟(LCB)	4	127°42'E	41°25'N	500~750
磐石市烟筒山(LYT)	4	126°10'E	43°17'N	350~450
延吉市帽儿山(LMS)	4	129°28'E	42°51'N	210~240
长白十二道沟(WCB)	4	127°42'E	41°25'N	500~750
磐石市烟筒山(WYT)	4	126°10'E	43°17'N	350~450
辽宁省凤凰山(WFH)	4	124°5'E	40°25'N	300~400

基因组操作试剂盒(大连宝生物工程有限公司)、DL 2 000 DNA Marker(大连宝生物工程有限公司)、2×Power Taq PCR Master Mix(北京百泰克生物技术有限公司)、随机引物(上海生工生物工程股份有限公司)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、溴化乙锭(EB)、琼脂糖(上海瓦兰生物技术有限公司)。

5×TBE 电泳缓冲液(1 000 mL):54 g Tris,27.5 g 硼酸,20 mL 0.5 M EDTA(pH 8.0),ddH₂O 补充至 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 每个单株取新鲜叶片 50 mg,采用试剂盒提取 DNA 后,用 1.5% 的琼脂糖凝胶置于 0.5×TBE 的电泳缓冲液中电泳 30 min,用 EB 染色 5 min,取出胶块于天能数码凝胶图像处理系统(上海,广州誉维生物科技仪器有限公司)中观察成像,记录 DNA 质量,并用微量分光光度计检测其浓度和纯度,最后将浓度稀释至 4 ng/μL,-20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 反应体系(20 μL):ddH₂O 9.2 μL,2×Power Taq PCR Master Mix 9 μL,模板 DNA 1 μL,引物 0.8 μL。扩增程序为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 40 s,36℃ 1 min,72℃ 1 min,38 个循环;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保温。取 4 μL 扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳中电泳 1 h 后,经溴化乙锭染色,置于天能成像系统中进行拍

照记数。每个引物重复 3 次,以确保条带的稳定性。

1.3 数据分析

RAPD 是显性标记,同一个引物扩增产物的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。根据凝胶同一位置片段的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,建立 0/1 数据矩阵,用 DPS 数据处理软件构建遗传距离矩阵,用 UPGMA 法(非加权的成对算术平均法)构建 RAPD 聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

分别用 2 种香茶菜的 DNA 模板进行扩增筛选,从 60 条 RAPD 随机引物中筛选出 5 条条带清晰、数量多、稳定性好和多态性高的引物用于 2 种香茶菜的 RAPD-PCR 反应(表 2)。

表 2 用于 RAPD 分析的 5 条随机引物序列

Table 2 Sequence of 5 random primers used in RAPD analysis

引物	序列(5'~3')	引物	序列(5'~3')
OPB-10	GTGTGCCCCA	OPO-05	CCACGGGAAG
OPD-08	CCCAGTCACT	OPO-06	AGGGAACGAG
OPD-11	CCACGGGAAG		

2.2 RAPD 扩增条带的多态性分析

利用 5 个引物分别对 2 种香茶菜的各个自然居群样品进行 RAPD 分析,由表 3 可知,扩增得到的清晰可记录的条带为 11~14 条不等。共扩增出 63 条可统计条带,其中多态性条带 55 条,占总条带数的 87.30%,平均每个引物扩增出 12 条带,其中 11 条是多态性条带,2 种香茶菜表现出较高的遗传多样性。图 1 为引物 OPD-08 对 2 种香茶菜样品的扩增结果对比图,图 2 为引物 OPO-05 对尾叶香茶菜样品 2 次重复试验的扩增结果。

表 3 蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜种群多态位点比率

Table 3 Percentage of polymorphic loci of

R. japonica var. *glaucoalyx* and *R. excise*

引物	条带数	多态性条带数	多态位点比率/%
OPB-10	11	10	90.91
OPD-08	14	12	85.71
OPD-11	12	10	83.33
OPO-05	12	11	91.67
OPO-06	14	13	92.86
Total	63	55	87.30

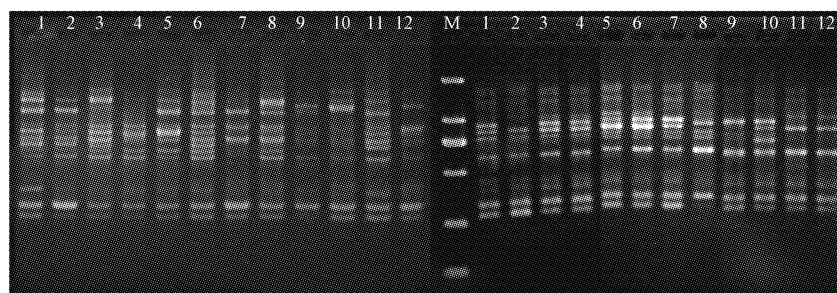


图 1 引物 OPD-08 对 24 份香茶菜样品的扩增

注:左 1~4 为 WCB,5~8 为 WYT,9~12 为 WFH;右 1~4 为 LCB,5~8 为 LYT,9~12 为 LMS。

Fig. 1 Amplified products of 24 samples of *Isodon* using primer OPD-08

Note: Left 1~4 is WCB,5~8 is WYT,9~12 is WFH; right 1~4 is LCB,5~8 is LYT,9~12 is LMS.

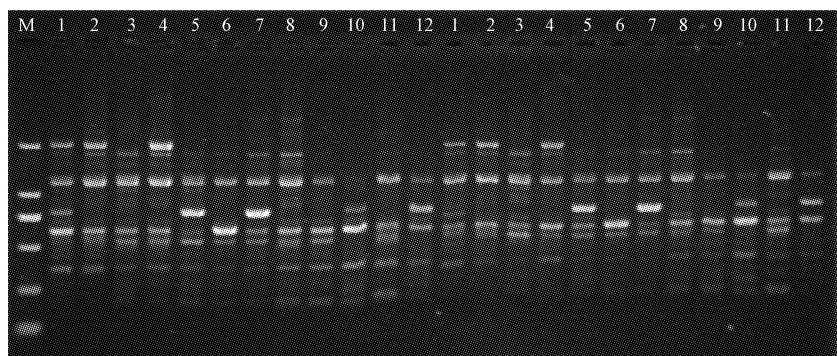


图 2 引物 OPO-05 对尾叶香茶菜样品的扩增结果

注:1~4 为 WCB,5~8 为 WYT,9~12 为 WFH,2 次重复。

Fig. 2 Amplified products of 12 samples of *R. excisa* using primer OPO-05

Note: 1~4 is WCB,5~8 is WYT,9~12 is WFH, repeat two times.

2.3 2种香茶菜居群间聚类分析

通过用 DPS 数据处理软件按 Nei's 遗传距离,得到蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜的 24 个样本的居群遗传距离,其范围约为 0.0000~0.4194,并使用 UPGMA 聚类法得出树状图(图 3)。从图 3 可以看出,在遗传距离 0.3143 处,聚类为二大类群,前 12 个是蓝萼香茶菜,后 12 个是尾叶香茶菜。蓝萼香茶菜的种内遗传距离较小,磐石烟筒山(LYT11)和长白县(LCB)的 4 个样品之间的遗传距离较近,为 0.0811,首先聚在一起,再与延吉帽儿山(LMS)的 4 个样品聚类,最后与磐石烟筒山(LYT)的其它 3 个样品聚集成为蓝萼香茶菜的类群。由于长白县(WCB6)与凤凰山(WFH)的 4 个样品遗传距离较近,为 0.1667,首先聚在一起,又与烟筒山(WYT)的 4 个样品聚在一起,最后于长白县(WCB2、4、8)的 3 个样品聚集成为尾叶香茶菜类群。图 3 结果明确显示出蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜的亲缘关系,但仍可看出 2 种香茶菜的种间差异大于种内差异。

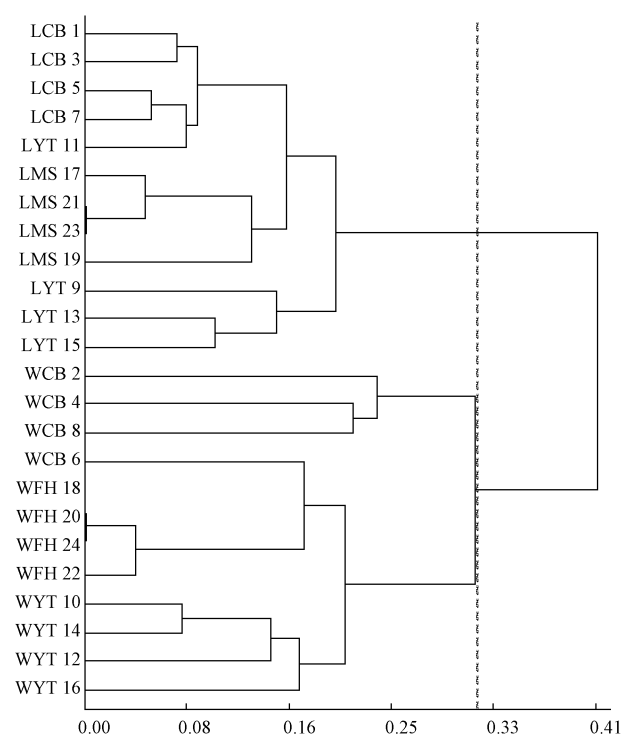


图 3 种源 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA based on Nei's genetic distance

3 讨论

利用 RAPD 标记可明确显示出供试材料种间和种内的遗传差异,并能根据种内不同基因型或种间差异将供试材料区分出来。长白县(WCB6)与丹东凤凰山(WFH)的 4 份尾叶香茶菜存在交叉现象,也许是因为尾叶香茶菜主要分布在东北地区,自然资源丰富,种内遗传差异较小。磐石烟筒山(LYT11)与长白县的 4 份蓝

萼香茶菜存在交叉现象,原因也是如此。由于采集的材料数量和地点有限,对研究这 2 种香茶菜的遗传多样性有一定的局限性,因此,今后可采集更多地区的香茶菜进行居群遗传多样性研究。

由于 RAPD 分子标记技术操作简便、快速、易行,近年来广泛的用于研究种群遗传结构和种质资源保存^[10-11],及药用植物的遗传关系^[12]。该试验结果表明,利用 RAPD 技术对香茶菜属植物的蓝萼香茶菜和尾叶香茶菜进行遗传分析时,表现出较强的区分能力,这也说明用 RAPD 标记技术分析香茶菜属植物种质资源遗传多态性的可行性。检测方法的稳定性是影响样本的遗传多样性和居群遗传结构的重要因素。该试验中,RAPD 对 DNA 模板的纯度和退火温度极为敏感,对聚合酶等条件在一定范围内的改变却稳定很多。这与 Schierwater 等^[13]和 Skroch 等^[14]的研究结论相符。因此,确保 DNA 模板的质量,使用同一批次的聚合酶,并且在同一台 PCR 仪进行试验,是获得重复性好的试验结果必要保障。

参考文献

- [1] 孙骏,郭莉.我国药用香茶菜属植物化学及药理学研究新进展[J].中草药,2002,33(8):3.
- [2] 那微,鲍建材.中药尾叶香茶菜研究现状及药用前景展望[J].人参研究,2006(1):13-17.
- [3] 曹露晔,陈子君.蓝萼香茶菜研究进展[J].云南中医中药杂志,2004,25(3):42-43.
- [4] 王勤,周至品,李爱媛.香茶菜属植物药理活性研究进展[J].现代医药卫生,2008,24(3):362-363.
- [5] 沈晓丹,王冰.蓝萼香茶菜的化学成分研究[J].中草药,2009,40(12):1883-1885.
- [6] 王福东,丁兰.蓝萼香茶菜三萜成分的研究[J].中国中药杂志,2005,30(24):1929-1932.
- [7] 海广范,李生莹.蓝萼香茶菜乙素对 AGZY 细胞周期及凋亡的影响[J].中国病理生理杂志,2010,26(7):1420-1422.
- [8] 张崇禧,王雪.长白山地区尾叶香茶菜化学成分的研究[J].中成药,2008,30(1):102-105.
- [9] 吴月霞,张伟.尾叶香茶菜化学成分的研究[J].中草药,2011,42(12):2402-2406.
- [10] Ma Y H, Dang R L, Wu X, et al. RAPD Analysis of genetic relationships in Ephedra in termedia from three local populations in sinkiang[J]. Chin Pharm J, 2003, 38(6):414-415.
- [11] Li X, Shao A J, Huang L Q, et al. Study on genetic differentiations among different strains of cultivated ginseng[J]. Chin Pharm J, 2005, 40(15): 1135-1137.
- [12] Ma X J, Wang X Q, Xu Z X, et al. RAPD Variation within and among populations of Ginseng cultivars[J]. Acta Bot Sin, 2000, 42:587-590.
- [13] Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products[J]. Nucl Acids Res, 1993, 21:4647-4648.
- [14] Skroch P, Nienhuis J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distances[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91:1086-1091.

结球甘蓝不同初级三体的花粉整齐度及生活力的研究

祝海燕

(潍坊科技学院, 山东 寿光 262700)

摘要:以“中甘 11”结球甘蓝初级三体为试材,结球甘蓝二倍体为对照,研究比较了其花粉生活力、花粉整齐度和花粉量。结果表明:结球甘蓝各初级三体花粉的花粉量、整齐度、生活力均低于二倍体,但不同三体之间存在着显著差异。经比较发现,三体 6 的花粉不管是在花粉量、花粉整齐度还是花粉生活力上与二倍体相比都达到了差异极显著水平,说明结球甘蓝第 6 染色体对花粉各方面的影响都较大,可能存在于花粉发育相关的基因。

关键词:结球甘蓝;初级三体;花粉整齐度;花粉生活力

中图分类号:S 635.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0090-03

初级三体是重要的遗传工具材料,利用初级三体可将基因及连锁群定位到特定染色体上,从而构建基因的物理图谱。由于三体增加了一条同源的额外染色体,位于该染色体上的 DNA 含量亦以等比例增加,因此必定会影响到植株性状的表现,现以结球甘蓝二倍体为对照,对结球甘蓝各初级三体的花粉生活力、花粉整齐度、花粉量进行了研究,旨在研究不同染色体的附加对结球甘蓝花粉生活力、花粉整齐度及花粉量的影响,以期对结球甘蓝三体有性繁殖的保存、利用及利用其进行基因定位提供遗传参数和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为“中甘 11”结球甘蓝初级三体系

作者简介:祝海燕(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为蔬菜学。

E-mail:zhuhaiyan1978@126.com

收稿日期:2013-01-21

植株。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉量的测定 用血球计数板测定花粉量。取单个花朵内即将开裂散粉的 6 枚花药置于洁净的小玻璃瓶中,加入 10%甘露醇水溶液 1 mL,制成花粉悬浮液,3 次重复。然后用血球计数板计数花粉数,并计算出平均单个花药中花粉量。

1.2.2 花粉整齐度的观察 于上午 9:00 左右分别采集各初级三体及二倍体当天散粉的花粉,将采集的新鲜花粉均匀地撒到洁净的载玻片上,在 40×镜下观察并记录花粉总数及畸形花粉数,各材料的观察花粉数为 1 000~1 500 粒,并统计正常花粉和畸形花粉所占的比例。

1.2.3 花粉生活力的测定 用 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)染色法进行花粉生活力的测定。用 10%的蔗糖溶液配成 0.5%的 TTC 染色液。将新鲜花粉涂在载玻片上,加 1~2 滴 TTC 染色液,盖上盖玻片,放入铺有湿

RAPD Analysis on the Genetic Diversity of Genus *Rabdosia* in Northeast China

ZHANG Bo, LIU Cui-jing, LIU Xia

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Taking 24 samples of *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) Hara and *Rabdosia excise* (Maxim.) Hara from different regions of northeast China as materials, the genetic diversity was studied using random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers. The results showed that 5 primers were selected from 60 primers. 63 DNA bands were amplified from the two species of *Rabdosia*, the percentage of polymorphism was 87.30%. Analysis of Nei's unbiased genetic distance showed that the genetic relationship between the two species of *Rabdosia* was significant. The genetic diversity was high, and the genetic diversity of interspecies was higher than that of interspecies. In conclusion, RAPD molecular marker technology could be an efficient method to study the genetic diversity of *Rabdosia* plants.

Key words: *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx*; *Rabdosia excise*; RAPD; cluster analysis