

鱼腥草 RAPD 分子标记的多态性

蓝云龙¹, 吴令上², 裘波音², 高燕会², 斯金平²

(1. 浙江省丽水市林业科学研究所, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江林学院 天然药物研发中心, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 分子标记技术对全国鱼腥草 *Houttuynia cordata* 主产区 23 个种源 24 个样本进行研究, 旨在阐明鱼腥草的遗传关系和遗传多样性, 为鱼腥草新品种选育、品系鉴别提供理论依据。结果表明, 160 条 RAPD 引物中筛选出 23 条具有多态性的引物, 共检测到 165 条清晰的条带, 其中多态性条带有 128 条, 占总条带的 77.58%, 平均每条引物可扩增到 7.1 条带, 多态性条带 5.5 条, 说明鱼腥草种内遗传多样性水平较高。通过聚类分析, 可将鱼腥草样本分为 3 个类型, 其分类和鱼腥草的形态特征等生物学特性存在显著的相关性, 同一类型中遗传多样性与种源的地理分布存在一定关系。图 1 表 2 参 16

关键词: 植物学; 鱼腥草; RAPD-PCR 反应; 遗传距离

中图分类号: S718.3; Q311

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2008)03-0309-05

Houttuynia cordata analysis with RAPD markers

LAN Yun-long¹, WU Ling-shang², QIU Bo-yin², GAO Yan-hui², SI Jin-ping²

(1. Forestry Science Institution of Lishui City, Lishui 323500, Zhejiang, China; 2. Centre for Research and Development of Natural Medicines, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To explain the genetic relationship and genetic diversity of *Houttuynia cordata*, 24 samples from throughout China were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) with random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers having 23 polymorphic primers screened from 160 RAPD primers. Then a cluster analysis was conducted. Results showed that 128 polymorphic bands were determined from the 165 clear bands accounting for 77.58%. From each primer, with an average of 7.1 bands, 5.5 polymorphic bands were amplified. The cluster analysis divided samples into 3 types according to their genetic distance, which got the same result with their morphological and biological characteristics. Thus, genetic diversity was high within *H. cordata*. These results will lay a theoretical foundation for breeding new varieties of *H. cordata*. [Ch, 1 fig, 2 tab, 16 ref.]

Key words: botany; *Houttuynia cordata*; RAPD-PCR; genetic distance

鱼腥草 *Houttuynia cordata* 为三白草科 Saururaceae 蕺菜属 *Houttuynia* 植物, 具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋等功能, 用于肺痈吐脓、痰热喘咳、热淋、热痢和痈肿疮毒等症^[1]。长期以来, 人们主要依靠采挖野生资源入药, 一方面导致野生资源日益减少, 另一方面因原料质量的差异导致成药质量不稳定, 其中鱼腥草注射液因不良反应, 2006 年 6 月曾被暂停使用, 同年 9 月 5 日国家食品药品监督管理局有条件地恢复使用, 这就要求鱼腥草生产企业必须建立自己的药源基地。种质资源是育种的物质基础, 种质资源遗传多样性研究将为评估基因资源的开发前景以及引种栽培和资源保护提供重要信息^[2,3]。随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 标记是 20 世纪 90 年代初发展起来的一种分子标记技术^[4-8], 广泛应用于药用植物研究中^[9-11]。吴卫等^[12]曾对鱼腥草进行了分子标记研究, 但由于其种源仅限于四川、重庆, 所得结果并不能很好反映鱼腥草资源的某些普

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2008-01-21

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2005C32052)

作者简介: 蓝云龙, 高级工程师, 从事药用植物研究。E-mail: 98lyl@163.com。通信作者: 高燕会, 副教授, 博士, 从事生物技术研究。E-mail: gaoyanhui408@126.com

遍性特征及信息,作者利用 RAPD 技术对 23 个来源于全国主产区的鱼腥草样品进行种质资源遗传多样性分析,旨在探讨各材料间遗传关系,为鱼腥草资源的合理利用和新品种选育提供理论依据,也为鱼腥草药材 DNA 指纹图谱的构建提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的鱼腥草材料 2006 年 12 月采自浙江林学院鱼腥草种质资源收集圃,包括江西、贵州、福建、云南、浙江、河南、湖南、广西、重庆、四川和安徽等 11 个省 23 个种源,其中云南省会泽县拖车镇的材料分为 2 个类型,共 24 个样品。详见表 1。

表 1 23 个鱼腥草种源及主要生物特性

Table 1 Twenty-three provenances of *Houttuynia cordata* and their major morphological characteristics

编号	种源	北纬	东经	花果量	生长初期形态		生长盛期形态		
					叶颜色	茎节间	叶颜色	叶缘形状	茎颜色
1	江西永丰	27°04′	115°05′	2.24	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
2	贵州贵阳	26°06′	106°07′	4.00	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
3	福建沙县	26°04′	117°08′	0.12	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	紫红色, 绿色
4	云南会泽	26°02′	102°07′	0.08	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	绿色
5	云南会泽	26°02′	102°07′	0.00	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	紫红色
6	贵州安顺	26°03′	105°09′	0.16	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	紫红色, 绿色
7	浙江莲都	28°05′	119°09′	2.36	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
8	河南正阳	32°07′	114°04′	1.56	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	紫红色, 浅红色
9	浙江庆元	27°06′	119°01′	2.04	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
10	湖南长沙	28°02′	113°00′	6.40	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
11	广西柳州	24°03′	109°04′	0.72	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	浅红色, 绿色
12	重庆开县	29°05′	106°05′	0.16	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	浅红色, 绿色
13	浙江嘉善	30°08′	120°09′	2.68	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
14	四川西昌	27°09′	102°03′	0.16	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	浅红色, 绿色
15	浙江开化	29°02′	118°04′	0.24	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	浅红色, 绿色
16	安徽绩溪	30°01′	118°06′	0.12	紫红色	较短	墨绿色	近全缘	浅红色, 绿色
17	浙江永康	28°09′	120°00′	3.60	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
18	浙江泰顺	27°05′	119°07′	4.20	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
19	浙江嵊州	29°05′	120°06′	2.12	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
20	浙江长兴	30°09′	120°00′	2.20	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
21	浙江松阳	28°04′	119°05′	1.60	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
22	浙江缙云	28°06′	120°01′	3.84	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
23	浙江云和	28°01′	119°06′	2.24	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色
24	浙江青田	28°02′	120°03′	4.00	绿色	较长	翠绿色	波状	浅红色

1.2 方法

1.2.1 形态特征观察 系统地观察鱼腥草叶片、茎秆颜色,叶缘形状和节间长短等形态特征,并统计 25 株鱼腥草植株每株开花结果数量。

1.2.2 DNA 提取和检测 采用 CTAB + 硅珠法提取鱼腥草 DNA^[13],其 DNA 的浓度和纯度用 U-008 OD 核酸/蛋白分析仪测定,并于 10 g·kg⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测, Gel Doc CR 凝胶成像系统下观察并照相。

1.2.3 鱼腥草的 RAPD 反应 鱼腥草 RAPD-PCR 扩增反应参照高燕会等^[14]有关杨梅 *Myria rubra* RAPD-PCR 反应体系的研究,其总体积为 20 μL,其中包括 2 μL 的 10 × Buffer 缓冲液, 41.67 nkat

Taq 酶, 2.5 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 0.3 mmol · L⁻¹ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 10 mmol · L⁻¹), 2.0 μmol · L⁻¹ 随机引物(10 μmmol · L⁻¹)。30 ng DNA 模板, 试剂购自上海生工公司。在 Gene Amo PCR System 9700 扩增仪上进行 PCR 扩增。反应程序为: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 38 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 循环 38 次; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃ 保存。扩增的反应产物于 10 g · kg⁻¹ 的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 mg · L⁻¹)电泳约 60 min, Gene Genius Bio Imaging System 拍照分析。

1.2.4 引物筛选 引物筛选包括初筛和复筛 2 个部分。先用 1 个鱼腥草 DNA 样品对 160 个随机引物进行初筛, 选择能扩增出清晰的谱带的引物用于引物的复筛。另选 3 个鱼腥草 DNA 样品对初筛引物进行复筛, 选择出多态性较强的引物用于 RAPD-PCR 扩增。在实验中, 如果所用材料的多态性较低而入选的引物较少时, 则需稍多的样品进行复筛, 以保证较高的有效筛选概率。

1.2.5 DNA 数据统计分析 RAPD 为显性标记, 扩增条带的有无用 1 和 0 来表示, 建立基本数据矩阵, 并用 Popgene 32 软件统计扩增产物的条带总数和多态性位点数量, 计算多态性条带所占比例和单个引物多态性条带数以及 Nei's (1978) 遗传距离, 最后用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析, 构建鱼腥草的分子系统树状图。

2 结果与分析

2.1 性状表现

根据不同种源的鱼腥草生长期的主要形态特征(表 1), 可将 23 个种源的鱼腥草分为 3 个类型: 类型 1 主要表现为生长初期叶绿色, 茎节间较长, 生长盛期叶翠绿色, 叶缘波状, 茎浅红色, 花果数量较多, 其平均数为 3.29 个; 类型 2 主要表现为生长初期叶带紫红色, 茎节间较短, 生长盛期叶墨绿色, 叶近全缘, 茎紫红色、浅红色或绿色, 花果数量少, 其平均数为 0.17 个。

2.2 RAPD 扩增结果

2.2.1 扩增片段多态性 通过对鱼腥草 DNA 进行初筛和复筛, 从 160 个随机引物中得到多态性较明显的 23 条 RAPD 引物, 共扩增出 165 个位点, 平均每条引物扩增出 7.1 个位点, DNA 片断大小分布为 0.2 ~ 1.8 kb, 其中 128 个位点具有遗传多样性, 约占总数的 77.58%, 每个引物检测到的多态位点平均为 5.5 个(表 2)。

表 2 RAPD 引物扩增条带的多态性

Table 2 RAPD primers and polymorphism of PCR products

引物 编号	碱基序列	扩增条 带数	多态性 条带数	多态性 比率/%	引物 编号	碱基序列	扩增条 带数	多态性 条带数	多态性 比率/%
S4	GGACTGGAGT	9	9	100.00	S85	CTGAGACGGA	3	2	66.67
S6	TGCTCTGCCC	11	11	100.00	S87	GAACCTGCGG	7	5	71.43
S10	CTGCTGGGAC	11	11	100.00	S89	CTGACGTCAC	8	6	75.00
S11	GTAGACCCGT	8	7	87.50	S105	AGTCGTCCCC	9	7	77.78
S37	GACCGCTTGT	8	6	75.00	S113	GACGCCACAC	5	3	60.00
S54	CTTCCCCAAG	6	4	66.67	S116	TCTCAGCTGG	6	5	83.33
S55	CATCCGTGCT	7	6	85.71	S125	CCGAATTCCC	6	5	83.33
S58	GAGAGCCAAC	8	6	75.00	S128	GGGATATCGG	4	3	75.00
S66	GAACGGACTC	5	4	80.00	S132	ACGGTACCAG	8	6	75.00
S71	AAAGCTGCGG	4	2	50.00	S144	GTGACATGCC	9	6	66.67
S79	GTTGCCAGCC	8	3	37.50	S168	TTTGCCCGGT	7	4	59.14
S82	GGCACTGAGG	7	6	85.71	平均数		7.1	5.5	77.58

2.2.2 鱼腥草的 RAPD-PCR 结果分析 利用 Popgene 32 软件对 RAPD 扩增所得多态性位点进行分析, 得到鱼腥草 24 个样品的遗传距离为 0.065 1~0.766 6 (表 3)。遗传距离越大, 表明样品间的遗传关系越远。可见, 鱼腥草样品 11 号(重庆开县)和 24 号(浙江青田)的遗传距离最大, 为 0.766 6, 表明它们之间的亲缘关系较远, 鱼腥草样品 18 号(浙江泰顺)和 19 号(浙江嵊州)间的遗传距离最小, 为 0.065 1, 这说明这 2 个样品间的遗传关系比较近。

在遗传距离矩阵的基础上, 利用 UPGMA 得到鱼腥草不同样品的聚类图 (图 1)。从 RAPD-PCR 结果的聚类图可以看出, 所有鱼腥草材料可划分为 3 大类。第 1 类 13 个种源, 包括 1, 2, 7, 9, 10, 13, 17, 18, 19, 20, 22, 21 和 23 号鱼腥草; 第 2 类 10 个种源, 包括 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 15 和 16 号鱼腥草; 第 3 类只有 1 个种源(浙江青田)。

聚类分析结果表明, 遗传距离与性状表现存在相关性, 同一类的鱼腥草性状表现相似。第 1 类主要表现为生长初期叶绿色, 茎节间较长, 生长盛期叶翠绿色, 叶缘波状, 茎浅红色, 花果数量较多; 第 2 类主要表现为生长初期叶带紫红色, 茎节间较短, 生长盛期叶墨绿色, 叶近全缘, 茎紫红色、浅红色或绿色, 花果数量少。

同一类型鱼腥草种源的遗传多样性与种源的地理分布存在一定关系, 在第 1 类中来自地理位置相近浙江种源的鱼腥草多数能聚为一类, 包括 17, 18, 19, 20, 22, 21 和 23 号鱼腥草。

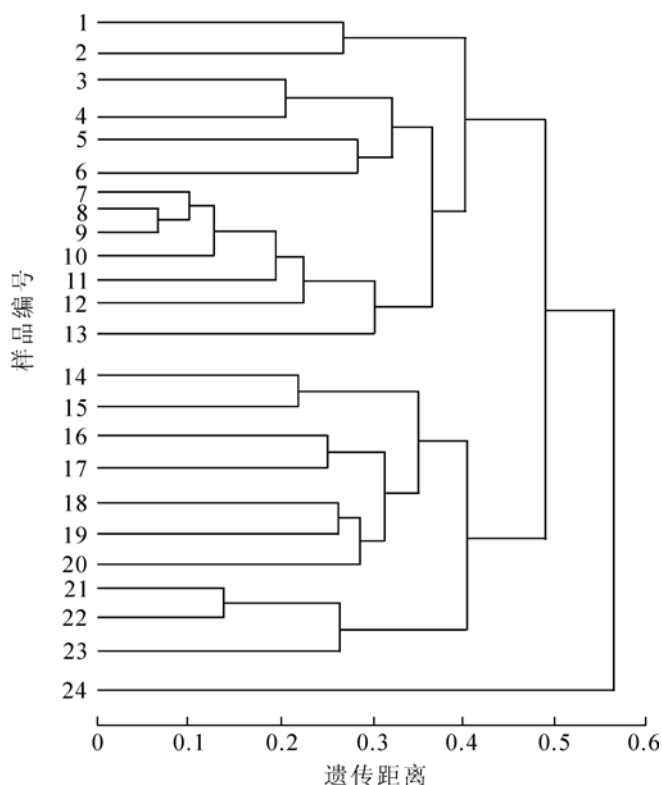


图 1 鱼腥草聚类图

Figure 1 Dendrogram Based Nei's genetic distance among 24 samples

3 结论与讨论

利用 RAPD 标记对鱼腥草种质 24 个样品遗传多样性进行检测, 结果鱼腥草种内遗传多样性水平较高, 23 个引物扩增得到 165 条带, 其中多样性条带 128 个, 占 77.58%。同时利用 RAPD 技术可将鱼腥草所有供试材料全部区分开, 并主要分为 3 个大类, 与鱼腥草形态特征与生物特性存在显著的相关性, 类型 1 主要表现为生长初期叶绿色, 茎节间较长, 生长盛期叶翠绿色, 叶缘波状, 茎浅红色, 花果数量多; 类型 2 主要表现为生长初期叶带紫红色, 茎节间较短, 生长盛期叶墨绿色, 叶近全缘, 茎紫红色、浅红色或绿色, 花果数量少。说明通过 RAPD 分子标记对鱼腥草种质资源品种群的划分和其形态划分是一致的。

由于遗传距离是评价品种间近缘关系的良好指标^[15,16], 鱼腥草根据 RAPD 标记划分的类型同地理分布有一定的关系, 地理位置(纬度或经度)较近的材料多数能聚在一起。由此可以看出药材道地性还与环境有一定的关系。聚类分析还表明, 用 RAPD 技术可将鱼腥草所有供试材料全部区分开, 这不仅为利用 RPAD 技术构建鱼腥草指纹图谱奠定了良好基础, 同时也进一步阐明了鱼腥草种质资源在分子水平上确实存在遗传差异。

同期, 我们对不同种源鱼腥草甲基正壬酮及其他挥发油研究结果(另文发表)表明, 鱼腥草甲基正壬酮及其他挥发油含量与种源形态特征、地理分布存在显著的相关性。鱼腥草种源形态、DNA、挥发油含量和地理分布的相关性, 进一步表明鱼腥草种源间形态与挥发油等变异具有遗传基础和变异规

律, 鱼腥草药材的品质很大程度上由其遗传因素所决定, 这为进一步开展鱼腥草新品种选育和人工栽培奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 2000 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 180–181.
- [2] 姜建国. 鱼腥草的开发利用[J]. 特种经济动植物, 2007, **10** (9): 37–38.
- [3] 印保林. 鱼腥草的栽培与开发[J]. 中国土特产, 1998 (3): 12–13.
- [4] GUPTA M, CHVIY S, ROMERO-SEVERSON J, *et al.* Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, **89**: 998–1 006.
- [5] KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K. Genetic linkage of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 37–45.
- [6] NAGAOKA T, OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat markers in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 597–602.
- [7] IQBAL M J. Identification of the IRS rye chromosomal segment in wheat by RAPD analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, **91**: 1 048–1 053.
- [8] JOSHI C P, NGUYEN H T. Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats [J]. *Genome*, 1993, **36** (3): 602–609.
- [9] 徐朝晖, 杨松松, 康廷国. 同种不同产地牛蒡子 DNA 指纹图谱特征研究[J]. 中草药, 2001, **32** (6): 541–542.
- [10] 张铭, 黄华荣, 廖苏梅, 等. 石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计[J]. 中国中药杂志, 2001, **26** (7): 442–447.
- [11] 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.
- [12] 吴卫, 郑有良, 陈黎, 等. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J]. 世界科学技术·中医药现代化, 2003, **5** (1): 70–85.
- [13] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石斛属植物种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (2): 156–161.
- [14] 高燕会, 朱玉球, 黄华宏, 等. 杨梅 RAPD-PCR 体系的正交优化研究[J]. 生物技术, 2006, **16** (3): 55–58.
- [15] 王凌晖, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 何首乌野生种质资源的 RAPD 指纹图谱构建[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, **29** (4): 37–40.
- [16] 邹游, 丁建, 申瑛, 等. 11 个猕猴桃品种间的遗传多样性分析[J]. 应用与环境生物学报, 2007, **13** (2): 172–175.