

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0102-106

中药溪黄草及其药用近缘种的 RAPD 分析^{*}

陈林姣¹, 陈月琴¹, 屈良鹄¹, 叶创兴¹, 赖小平²

(¹中山大学生命科学学院, 广州 510275; ²广州中医药大学)

摘 要: 运用 14 个有效的 10 mer-寡核苷酸引物对中药溪黄草原植物线纹香茶菜 *Isodon lophanthoides* 及其药作近缘种基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共检出 194 个位点, 其中单态位点 14 个, 占 7.2%; 多态位点 180 个, 占 92.8%; 分类群特有位点 108 个, 占 55.7%。用 UPGMA 法对分类群间的 Jaccard 相似性系数和遗传距离进行聚类分析, 结果表明, 狭基线纹香茶菜和细花线纹香茶菜与溪黄草的亲缘关系较近, 而溪黄草与线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜之间的亲缘关系远, 可用 RAPD 技术对中药的正本清源、真伪品及质量进行研究。

关键词: 中药溪黄草, 近缘种, RAPD 分析

分类号: Q 949.72, Q 7 **文献标识码:** A

中药溪黄草是民间常用的一种中草药, 用于治疗湿热泻痢、跌打瘀肿、急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎等疾病。近年来, 中药溪黄草在华南各地临床上广为应用, 并出现了一些以其为主要原料的保健产品, 具有较大的开发应用前景。中药溪黄草的原植物为香茶菜属 *Isodon* 的线纹香茶菜 *Isodon lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara^[1]。然而, 药材的原植物来源比较复杂, 品种混乱, 除线纹香茶菜外, 还有同属植物狭基线纹香茶菜 *I. lophanthoides* var. *gerardiana* (Benth.) H. Hara, 细花线纹香茶菜 *I. lophanthoides* var. *graciliflora* (Benth.) H. Hara, 溪黄草 *I. serra* (Maxim.) Kudo^[2]。有关中药溪黄草及其伪品的鉴定, 目前多局限于对其药材性状及其组织显微特征的比较鉴别^[3]。分子生物学的发展为生药的正本清源及其质量监测提供了新的手段和方法。RAPD 分析简单易行, 在属级以下水平的分类与进化^[4-5] 以及栽培品种的分类和识别^[6] 等研究中有着广泛应用, 在中药鉴定中也有报道^[7]。本文应用 RAPD 方法对中药溪黄草的 4 种基源植物 (包括变种) 进行鉴别, 并初步探讨其亲缘关系, 为进一步明确它们在临床上能否等同入药及寻找相似新药源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜和溪黄草 (表 1), 每个分类群各取

^{*} 基金项目: 国家杰出青年基金 (39525007); 国家自然科学基金 (39770058)

收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 陈林姣, 女, 27 岁, 硕士, 现在厦门大学生物学系工作

10 株植物的幼嫩叶片，混合提取总 DNA。标本存于广州中医药大学。

表 1 材料的代号、名称、采集地和凭证号¹⁾
Tab 1 Symbols names origin and voucher No of plants

编号	名 称	采集地	采集株数	凭证号
1	溪黄草 <i>Isodon serra</i>	广州华南植物园	10	95081
2	线纹香茶菜 <i>I. lophanthoides</i>	广州华南植物园	10	97072
3	细花线纹香茶菜 <i>I. lophanthoides</i> var <i>graciliflora</i>	广州华南植物园	10	50909
4	狭基线纹香茶菜 <i>I. lophanthoides</i> var <i>gerardiana</i>	广州华南植物园	10	95076
5	狭基线纹香茶菜 <i>I. lophanthoides</i> var <i>gerardiana</i>	广东瑶坪县	10	95078

1) 拉丁学名承蒙昆明植物研究所李锡文教授核定

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 的提取与纯化 采用 CTAB 法^[7] 提取植物总 DNA，用 DPS 纯化系统（包括玻璃粉、NaI，由中山大学真核分子生物学实验室制备）纯化。

1.2.2 RAPA 反应 总体积 15 μL，其中含 2.0 mmol/L MgCl₂；100 μmol/L 的 dNTP（dATP，dCTP，dGTP 和 dTTP）（华美）；Operon 公司指定的引物浓度（加 1/10 体积的引物），约 10 ~15 ng 总 DNA；16.67×10⁻⁹ mol/s Taq 酶（Promega 公司产品）；对照用双蒸水代替总 DNA。整个扩增程序为：94℃ 5 min，1 个循环；94℃，1 min；35℃，1 min；72℃，2 min，45 个循环，最后 72℃，延伸 7 min。扩增产物在 w=1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，紫外灯下观察结果，照相。

1.2.3 扩增产物的分析方法 在相片上量出相对分子质量标记物各带和扩增产物各带的迁移率 M，采用最小二乘法回归，求出 $x=1/M$ ， $Y=\lg L$ （L 为相对分子质量）的线性函数（ $1/M=a\lg L+b$ ），编制程序，算出各扩增产物相对分子质量大小。每一带在某一存在记作 1，缺乏记作 0，强带和弱带的赋值均为 1，仅那些可重复的带才被用于数据分析。

分类群间的 Jaccard 相似性系数用公式 $S_J=a/(a+b+c)$ 计算，其中，a 为 2 种共有带数、b 为 B 种有而 C 种没有的带数、c 为 C 种有而 B 种没有的带数；距离系数采用公式 $1-F$ 进行计算，其中 $F=2a/(2a+b+c)$ 。用 UPGMA 法对分类群彼此间的相似性系数和距离系数进行聚类分析，运用程序^[8]（稍有改动）在计算机上计算。

2 实验结果与讨论

2.1 随机引物的筛选

对 76 个 10 个核苷酸长的随机引物（Operon 公司）进行筛选。只有那些能得到清晰的、可重复的扩增产物的引物才用于 RAPD 分析，共选出了 14 个有效引物（表 2）。

2.2 DNA 多态性分析

不同引物扩增出的 DNA 片段数从 4~28 个不等，片段大小为 360~3 000 碱基对，含有丰富的 DNA 多态信息（图 1a~f）。有的引物对狭基线纹香茶菜 2 个不同产地的种也检出多态位点（图 1a、d），14 个有效引物共检出 194 个位点，其中单态位点 14 个，占

7.2%；多态位点 180 个，占 92.8%；种特有位点 108 个，占 55.7%（表 2）。特异性带可作为区别种以及变种的遗传标记，而比较保守的单态带则可用于较高水平的分类。

表 2 引物及序列

Tah 2 Primers used for RAPD amplification

OPA-04AATCGGGCTG	OPC-02GTGAGGCGTC	OPC-16 CACACTCCAG	OPD-02GGACCCAACC
OPD-03GTGCGCGTCA	OPD-07TTGGCACGGG	OPD-08GTGTGCCCCA	OPD-18GAGAGCCAAC
OPD-20ACCCGGTCAC	OPG-03GAGCCCTCCA	OPG-10AGGGCCGTCT	OPG-13CTCTCCGACA
OPG-17ACGACCGACA	OPG-19GTCAGGGCAA		

对 14 个有效引物的 RAPD 反应各进行至少 1 次的重复试验。结果表明：在反应条件严格一致的情况下，绝大部分引物的重复性均很好，个别引物扩增出来的强带稳定性好，而个别弱带不稳定。因此，记录重复性好的带，不能重复出现的弱带不作记录。

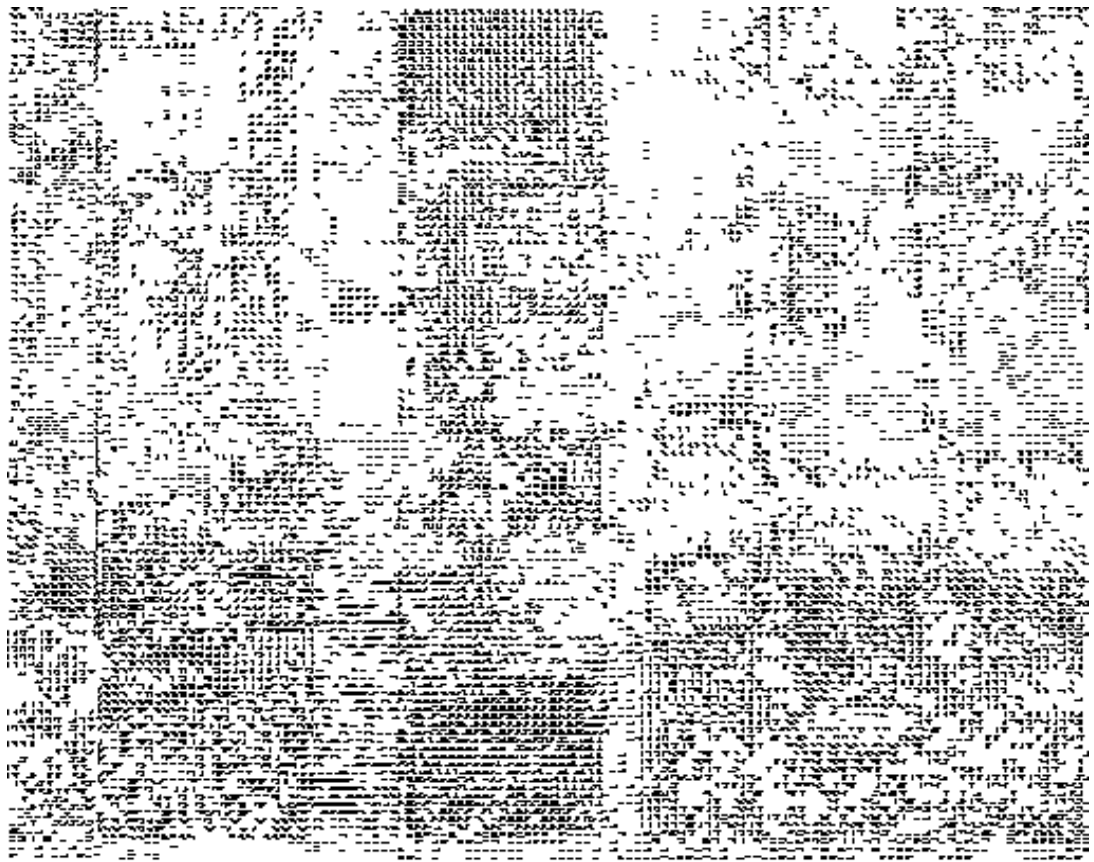


图 1 扩增 DNA 指纹图谱

Fig 1 PAPD profiles generated by primer

引物: (a) A-04; (b) D-03; (c) D-07; (d) D-20; (e) G-19; (f) C-20

2.3 分类群间亲缘关系

采用 UPGMA 法对 Jaccard 相似性系数（表 3）和遗传距离系数（表 4）进行聚类分析，得到树状图（图 2，3）。

表 3 分类群间的 Jaccard 相似性系数
Tab. 3 Similarity between species according to the Jaccard's coefficient of similarity

	1	2	3	4	5
1	1				
2	0.131	1			
3	0.092	0.504	1		
4	0.104	0.482	0.671	1	
5	0.106	0.495	0.677	0.840	1

表 4 各分类群间的距离系数
Tab. 4 Matrix of 1- F values between species

	1	2	3	4	5
1	0				
2	0.768	0			
3	0.831	0.329	0		
4	0.812	0.350	0.195	0	
5	0.808	0.338	0.192	0.087	0

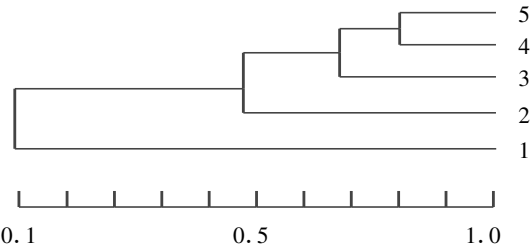


图 2 用 Jaccard 相似性系数、UPGMA 法聚类分析产生的树状图
Fig. 2 Phenogram constructed by UPGMA cluster analysis of Jaccard's coefficient

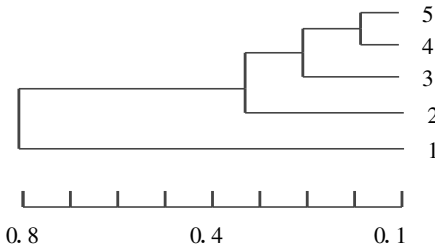


图 3 用距离系数、UPGMA 法聚类分析产生的树状图
Fig. 3 Phenogram constructed by UPGMA cluster analysis of genetic distance

从聚类分析的结果（图 2，3）可以估计各分类群间的亲缘关系。溪黄草与线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜之间的相似性系数（最大为 0.131）远远小于线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜三者中任意两者之间的相似性系数，其距离系数（最小为 0.768）则大于后三者中任意两者间的距离系数，这说明溪黄草与线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜之间的亲缘关系远。在传统分类学上，溪黄草与线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜同属于香茶菜属 *Isodon*，但分属于香茶菜组（Sect. *Amethystoides* Benth.）和皱叶香茶菜组（Sect. *Isodon*）。RAPD 分析结果与它们所处的传统分类学位置相符合。线纹香茶菜与狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜的 Jaccard 相似性系数分别为 0.482，0.504，遗传距离分别为 0.350，0.329，狭基线纹香茶菜与细花线纹香茶菜的 Jaccard 相似性系数为 0.674，遗传距离为 0.195，这表明线纹香茶菜跟狭基线纹香茶菜和细花线纹香茶菜的亲缘关系较近，狭基线纹香茶菜与细花线纹香茶菜的亲缘关系最近。RAPD 分析结果与对线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、细花线纹香茶菜三者的叶表皮结构^[8]、茎和叶的解剖特征（待发表）和花粉形态特征（待发表）研究所得结果基本吻合。

RAPD 分析结果还表明，两个不同产地的狭基线纹香茶菜的相似性系数非常大，但在某些引物的扩增物上存在小的差异。因此，RAPD 分析可为地道药材的研究和种群间的遗传变异提供分子生物学方面的依据。此外，从它们已知的化学成分来看，溪黄草主要药理

活性成分萜类为对映贝壳松烯型^[3]; 而线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜所含萜类为松香烯型^[9, 10], 这提示该属植物亲缘关系越近, 所含化学成分越相似, 因而 RAPD 分析也可为寻找相似药效的新资源提供线索。

昆明植物研究所李锡文教授审核了有关植物标本的鉴别, 特此致谢。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典, 下册. 上海: 上海科学出版社, 1977: 25
- [2] 陈建南, 赖小平, 刘念. 广东溪黄草药材的原植物调查及商品鉴定. 中药材, 1996, 19 (2): 73
- [3] 赖小平, 陈建南, 陈林姣, 等. 中药溪黄草类的研究进展. 广州中医药大学学报, 1995 (4): 83
- [4] LUQUE T, RUZ C, AVALOS J, et al Detection and analysis of genetic variation in *Salicornieae* (Chenopodiaceae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Taxon, 1995, 44 (1): 53
- [5] HALWARD T M, STALKER H T, LARUE E A, et al Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted gemplasm resources of cultivated peanut and related wild species. Genome, 1991, 34: 1013
- [6] SHAW P C, PAUL P H B. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random primed polymerase chain reaction. Planta Med, 1995: 466
- [7] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11
- [8] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序. 武汉: 武汉大学出版社, 1990
- [9] 赖小平, 陈林姣. 广东溪黄草类叶表皮结构及扫描电镜观察. 广州中医药大学学报, 1996 (4): 57
- [10] YUN L X, DAN W, LI X J, et al Abietane quinones from *Rabdosia lophanthoides*. Phytochemistry, 1989, 28 (1): 189

RAPD Analysis on Chinese Medicine Xihuangcao and Its Related Species

CHEN Linjiao^{*}, CHEN Yueqin, QU Lianghu, YE Chuangxing, LAI Xiaoping

Abstract: Four original plants of Chinese Medicine Xihuangcao were analysed using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Fourteen primers were selected from 76 primers. A total of 194 bands were scored reproducibly by 14 primers. 92.8% of the total bands were polymorphic and 55.7% of the total bands were unique. The unique bands could be used as molecular markers for identification. RAPD markers were analyzed using similarity and genetic distance. Phenograms were constructed by using UPGMA method. Based on the results of the analysis and on a review of morphological characteristic, *Isodon. lophanthoides* var. *gerardiana* and *I. lophanthoides* var. *graciliflora* could be used as Chinese Medicine Xihuangcao. However, it needed to make a further study on potential medicinal usage of *I. serra*. The results showed that RAPD was feasible as a molecular marker for identification in Chinese Medicine, and it was also potential for studying evolution and relationships between specific and infraspecific taxa

Keywords: Xihuangcao (*Isodon*), original plants, RAPD analysis

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China