

梔子及其近缘类群的随机扩增多态 DNA 分析

★ 葛菲 (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:探索梔子与其变种雀舌梔子、重瓣梔子及变型水梔子之间的亲缘关系。方法:从 56 个随机引物中筛选出 12 个引物对梔子及其近缘类群进行随机扩增多态 DNA 分析,应用 SPSS10.0 分析软件中的 Jaccard 方法计算任意两样品间的相似系数,用组内聚类方法计算得出聚类树状图。结果:共得到 251 个有效位点。聚类分析显示,梔子与重瓣梔子最先聚类,然后与水梔子聚类,最后与雀舌梔子聚类。结论:重瓣梔子与梔子亲缘关系最近,雀舌梔子与梔子的亲缘关系最远。

关键词:梔子;近缘类群;随机扩增多态 DNA

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A

RAPD Analysis for *Gardenia jasminoides* and Relatives

GE Fei

Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To probe relative relationship among *Gardenia jasminoides*, its varieties (*G. jasminoides* Ellis. var. *radicans* and *G. jasminoides* Ellis. var. *fortuniana*) and its forma (*G. jasminoides* Ellis. f. *longicarpa*). Methods: RAPD analysis for samples of *Gardenia jasminoides* and relatives were performed by 12 random primers screened from 56. Proximity matrix was analyzed by SPSS version 10.0 software and rescaled distance cluster combine was obtained by cluster analysis within groups. Results: A total of 251 polymorphic loci were amplified. It showed that *Gardenia jasminoides* were clustered with *G. jasminoides* Ellis. var. *fortuniana* at first, then with *G. jasminoides* Ellis. f. *longicarpa*, and with *G. jasminoides* Ellis. var. *radicans* at last. Conclusions: Among samples, *Gardenia jasminoides* was the closest relative to *G. jasminoides* Ellis. var. *fortuniana*, and most distant relative to *G. jasminoides* Ellis. var. *radicans*.

Key Words: *Gardenia jasminoides*; Relatives; RAPD

梔子为常用中药,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效。分布在长江流域及以南地区,为酸性土壤指示植物。梔子有 3 变种和 1 变型^[1-7],即梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis.、雀舌梔子 *G. jasminoides* Ellis. var. *radicans* (Thunb.) Makino、重瓣梔子 *G. jasminoides* Ellis. var. *fortuniana* (Lindl.) Hara.、大花梔子 *G. jasminoides* var. *grandiflora* Nakai.、水梔子 *G. jasminoides* Ellis. f. *longicarpa* Z. W. Xie et Okada.,它们在形态结构上均具有一定的差异,为了探索它们之间的亲缘关系,笔者采用随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 技术对其进行了分析。

1 仪器、试剂和材料

1.1 仪器 PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ RESEARCH INC, 美国), 高速离心机 IEC Micro-MB centrifuge (IEC 公司, 美国), DZKW-C 型水浴锅 (河北省黄骅航天仪器厂), DYY-III-5 型稳压稳流电泳仪 (北京市六一仪器厂), 凝胶紫外成像系统 (SYNGENE ADIVISION of SYNOPRIS LTD, 美国), 核酸紫外定量仪 GENEQUANTII (Pharmacia Biotech, 英国)。

1.2 试剂 Taq 酶 (华美生物工程公司, 200 u, 3 μL/μL), 琼脂糖 (西班牙, 华美公司分装), dNTP (华美公司), CTAB (Sigma 公司), 溴化乙锭 (Fluka 公司), Tris 碱 (Ultra Pure, 华美公司), EDTA (华美公司), 巯基乙醇 (上海生工公司), 随机引物

(上海生工公司), 其余试剂为北京化工厂产的分析纯。

1.3 材料 梔子、雀舌梔子、重瓣梔子、水梔子的叶片均由笔者采集鉴定, 用硅胶快速干燥保存, 样品采取混合取样, 编号如表 1。

表 1 实验材料来源、采集时间

编号	名称	学名	产地	采集时间
1	梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis.	江西中医学院药圃	2002.9
2	雀舌梔子	<i>G. jasminoides</i> Ellis. var. <i>radicans</i> (Thunb.) Makino	江西中医学院药圃	2002.9
3	重瓣梔子	<i>G. jasminoides</i> Ellis. var. <i>fortuniana</i> (Lindl.) Hara.	江西中医学院药圃	2002.9
4	水梔子	<i>G. jasminoides</i> Ellis. f. <i>longicarpa</i> Z. W. Xie et Okada.	江西中医学院药圃	2002.9
5	水梔子	<i>G. jasminoides</i> Ellis. f. <i>longicarpa</i> Z. W. Xie et Okada.	江西瑞金岗背村	2002.9

2 方法

2.1 DNA 提取和浓度测定 将干叶片约 0.2 mg 置于 1.5 mL EP 管中, 加入液氮约半分钟后用镊子碾碎成细粉, 立即加入 500 μL 2×CTAB 提取缓冲液 [CTAB2%, Tris-HCl (pH8.0) 100 mmol·L⁻¹, EDTA20 mmol·L⁻¹, NaCl1.4 mol·L⁻¹, 巯基乙醇 2%] 和 20 μL 巯基乙醇, 60℃ 水浴保温 1 小时后, 加入氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提, 轻颠倒混匀, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液, 加入等体积 CTAB 沉淀缓冲液 [CTAB1%, Tris-HCl (pH 8.0) 50 mmol·L⁻¹, EDTA10 mmol·L⁻¹, 巯基乙醇 1%], 室温下放置 0.5 小时以上,

1 000 0 r·min⁻¹离心 10 分钟,小心倾去上清液,沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇各轻洗一次,弃洗液,留沉淀挥干。用 20 μ L TE 溶解备用。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,以 λ DNA 作对照和用核酸紫外定量仪测定浓度相结合。

2.2 DNA 模板浓度的选择 用 S267 引物对 DNA 模板的不同浓度扩增结果比较,选择扩增效果好的浓度进行扩增。

2.3 PCR 扩增 25 μ L 反应体系:dNTPs(10 mmol·L⁻¹)1.5 μ L,引物(10 μ mol·L⁻¹)0.5 μ L,DNA 模板约 42 ng,Taq 酶(3 μ L/ μ L)0.5 μ L,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹)1.5 μ L,10 × Reaction Buffer 2.5 μ L。扩增程序为:预变性 96 $^{\circ}$ C,5 min;扩增循环 40 个,为 94 $^{\circ}$ C 45 秒,34 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min;后延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。取 8 μ L 扩增产物于 1.8% 琼脂糖凝胶上用 1 × TAE 电泳缓冲液电泳,凝胶紫外成像系统检测拍照。

2.4 引物筛选 以 1 和 2 号两个模板,用随机引物在上述条件下扩增,选择条带清晰、重复性好的引物作为扩增引物用于 RAPD 扩增。

2.5 数据分析 电泳图谱中的每一条带(DNA 片段)均为一个分子标记,并代表一个引物结合点,根据分子标记的有无及其迁移率统计得到有位点的二元数据,有带计为 1(强带与弱带同计),无带计为 0。应用 SPSS10.0 分析软件中的 Jaccard 方法计算任意两样品间的相似系数,用 Within group 聚类方法计算得出聚类树状图。

3 结果与讨论

(1)从 56 个引物中筛选出 12 个条带清晰、多态性明显的扩增产物分子量在 200~2 000 bp 之间的引物 12 个(见表 2),共得到 251 个有效位点,其中引物 S28、S180 对样品的扩增结果见图 1。经 SPSS10.0 分析软件得任意两样品间的相似系数(见表 3)和聚类树状图(见图 2)。

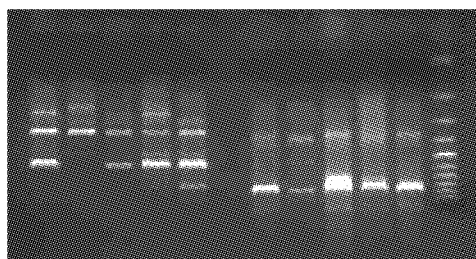


图 1 S28、S180 对样品扩增的产物电泳图谱

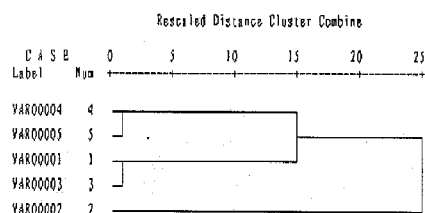


图 2 聚类树状图

表 2 本实验所用引物序列

引物号	序列 5'~3'
S18	GTGACGTAGG
S350	AAGCCCGAGG
S180	AAAGTGC GGC
S393	ACCGCTGCT
S515	GGACAACCAG
S185	TTTGGGGCCT
S2010	GGACGTTGAG
S190	ACCGTTCAG
S267	CTGGACGTCA
S330	CCGACAAACC
S120	GGGAGACATC
S1204	CCAGGAGAAG

表 3 样品之间相似系数矩阵

样品	1	2	3	4	5
1		0.421	0.574	0.477	0.505
2	0.421		0.456	0.356	0.286
3	0.574	0.456		0.495	0.427
4	0.447	0.356	0.495		0.575
5	0.505	0.286	0.427	0.575	

(2)图 2 表明,样品 4 和 5 最先聚类说明其亲缘关系密切,相似系数最大(0.575)亦说明了这点,它们为水梔子的不同居群,但样品 4 的结果率远低于样品 5,样品 4 生于中医学院药圃,周围没有水源,生境相对较干燥,且周围有较高的乔木遮挡部分阳光,而样品 5 生长于水沟两侧,周围是稻田,阳光和水分充足;样品 4 和 5 的差别可能是生态环境的不同而引起的。表 3 表明,样品 1 和样品 3 相似系数为 0.574,样品 1 与样品 2 的相似系数为 0.421,样品 1 与样品 4 相似系数为 0.477。遗传距离计算公式^[8]为:DS = 1 - SI,DS 为遗传距离,SI 为相似系数,相似系数越大,遗传距离越小,亲缘关系则越近。与样品 1 梔子相似系数比较,样品 3 重瓣梔子(0.574) > 样品 4 水梔子(0.477) > 样品 2 雀舌梔子(0.421),样品 1~4 均采自学院药圃,它们的生长环境一致,说明它们的差异来自物种内部。实验表明,重瓣梔子与梔子亲缘关系最近,雀舌梔子与梔子的亲缘关系最远。从形态上看,雀舌梔子为矮小灌木,叶小,花小且为重瓣,这些特征与其它种差别很大,图 2 聚类结果亦表明雀舌梔子与另几种关系较远。

参考文献

- [1]谢宗万. 水梔子的品种考证及品质评价会议[J]. 中药材, 1991,14(7):45
- [2]《浙江药用植物志》编写组编. 浙江药用植物志(下册)[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1974.1 212
- [3]吴修仁. 广东药用植物简编[M]. 广州:广东高等教育出版社, 1989.450
- [4]徐国均. 中药材粉末显微鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986.472
- [5]中国科学院植物研究所. 江苏南部种子植物手册[M]. 北京:科学出版社,1959.706
- [6]谢宗万主编. 全国中草药汇编(第二版)(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1999.766
- [7]付小梅,赖学文,葛菲,等. 中药梔子类药材资源调查和商品药材鉴定[J]. 中国野生植物资源,2002,21(5):23
- [8]吕雪梅,杨克福,张细权. RAPD 分析中遗传距离计算方法的比较[J]. 华南农业大学学报,1997,18(增刊):90

(收稿日期:2006-02-14)